

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-155778

(43)Date of publication of application : 22.06.1993

(51)Int.Cl.

A61K 35/78

A61K 35/66

A61K 35/80

A61K 37/20

A61K 37/20

(21)Application number : 03-357351

(71)Applicant : CHIBA SEIFUN KK

MIZUNO DENICHI

SOMA GENICHIRO

(22)Date of filing : 02.12.1991

(72)Inventor : SOMA GENICHIRO

YOSHIMURA ATSUSHI

TSUKIOKA DAISUKE

MIZUNO DENICHI

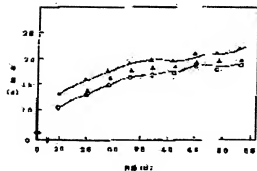
OSHIMA HARUYUKI

## (54) GROWTH PROMOTER AND ANIMAL GROWTH PROMOTER CONTAINING LPS

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a growth promoter and an animal growth promoter, having high growth promoting effects, usable for a long period and administrable by any of oral or percutaneous route, transcutan bath or injection.

CONSTITUTION: A growth promoter is characterized by including at least one of the following lipopolysaccharide (LPS) therein: An LPS capable of providing a content of the LPS, positive to the Limulus test and affording an ED50 of the macrophage activating ability of 0.4-100ng/ml culture solution when sigmoid curves are drawn by using the macrophage activating ability of the LPS activating the TNF productivity of an in vitro



cultured macrophage as an index and plotting the macrophage activating ability (%) in the

macrophage activating ability providing the TNF production of the macrophage without adding the LPS as 0%, and the macrophage activating ability when the TNF production of the macrophage attains the maximum constant amount as 100% on the coordinate axis versus the content of the LPS positive to the Limulus test at that time expressed on the logarithmic scale on the abscissa axis.

---

#### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

A05-155778

\* NOTICES \*

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] Are a growth accelerator containing LPS and macrophage activation ability of LPS which activates the TNF production ability of the macrophage cultivated by in vitro one is made into an index. The macrophage activation ability which gives the amount of TNF production of the macrophage when not adding the LPS to an axis of ordinate 0%, The macrophage activation ability (%) which makes 100% macrophage activation ability of LPS when making the amount of TNF production of a macrophage into the maximum constant weight is expressed. The growth accelerator containing at least one sort of LPS which is the rim lath test positivity LPS content, or the 0.4 · 100ng / culture medium ml which gives ED50 of macrophage activation ability when drawing the sigmoid curve which expresses the rim lath test positivity LPS content of the LPS with an axis of abscissa by the logarithmic scale.

[Claim 2] The growth accelerator according to claim 1 chosen from the group which LPS becomes from LPS obtained from vegetation, LPS obtained from bacteria, lipid A, those \*\*\*\* LPS, and those mixture.

[Claim 3] The growth accelerator according to claim 2 which is LPS in which LPS obtained from vegetation is obtained from wheat, and has the following physical properties.

Main molecular weight: 8,000\*\*1,000 (based on SDS-1 law)

8,000\*\*1,000 (based on SDS-2 law)

5,000\*\*2,000 (based on SDS-2 law)

number of Linn: · number of 1·4-/molecular weight 8000 hexosamines: · number of 6\*\*2-/molecular weight 8000 fatty acids: · the 6\*\*2-/molecular weight 8000 · the KDO number =5\*\*1/molecular weight 8000 · [Claim 4] The growth accelerator according to claim 2 which is LPS in which LPS obtained from vegetation is obtained from chlorella, and has the following physical properties.

Main molecular weight = 40,000-90,000 (based on SDS-2 law)

number of Linn = · number of 4\*\*1-/molecular weight 10,000 hexosamines = · the number of 7\*\*1-/molecular weight 10,000 fatty acids · the =6\*\*1/molecular weight 10,000 · the KDO number =2\*\*1/molecular weight 10,000 · [Claim 5]

The growth accelerator according to claim 2 which is LPS in which LPS obtained from bacteria is obtained from Escherichia coli, and has the following physical properties.

Main molecular weight = 40,000\*\*10,000 (based on SDS-2 law)

8,000\*\* 4,000 (based on SDS-2 law)

number of Linn = · number of 12-/molecular weight 30,000 hexosamines = · the number of 45\*\*6-/molecular weight 30,000 fatty acids · the =18/molecular weight 30,000 · the KDO number =5\*\*1/molecular weight 30,000 · [Claim 6] The growth accelerator according to claim 2 whose LPS obtained from bacteria is LPS which has the following physical properties.

Main molecular weight: 5,000\*\*1,000 (based on SDS-2 law)

number of Linn: · number of 2\*\*1-/molecular weight 5,000 hexosamines: · 9\*\*1-/molecular weight 5,000KDO number: · the 2\*\*1-/molecular weight 5,000 · [Claim 7] The growth accelerator according to claim 2 whose LPS obtained from bacteria is LPS which has the following physical properties.

Main molecular weight: 6,500\*\*2,500 (based on SDS-2 law)

number of Linn: · number of 1·2-/molecular weight 5,000 hexosamines: · 7\*\*1-/molecular weight 5,000KDO number: · the 1·2-/molecular weight 5,000 · [Claim 8] The growth accelerator according to claim 2 whose LPS obtained from bacteria is LPS which has the following physical properties.

Main molecular weight: 6,500\*\*2,500 (based on SDS-2 law)

number of Lysine: -- number of 2\*\*1-/molecular weight 5,000 hexosamines: -- 5\*\*1-/molecular weight 5,000KDO number: -- the 2\*\*1-/molecular weight 5,000 -- [Claim 9] The growth accelerator according to claim 2 which is LPS in which LPS obtained from bacteria is obtained from Bordetella pertussis, and has the following physical properties.

Main molecular weight = 6,000\*\*1,000 (based on SDS-2 law)

number of Lysine = -- number of 4-/molecular weight 6000 hexosamines = -- the number of 12-/molecular weight 6000 fatty acids -- the 4-/molecular weight 6000 -- the KDO number = 2\*\*1-/molecular weight 6000 -- [Claim 10] The growth accelerator according to claim 2 whose LPS obtained from bacteria is A. RADIOBAKUTA LPS.

[Claim 11] Are a growth accelerator for animals containing LPS, and macrophage activation ability of LPS which activates the TNF production ability of the macrophage cultivated by in vitro one is made into an index. The macrophage activation ability which gives the amount of TNF production of the macrophage when not adding the LPS to an axis of ordinate 0%, The macrophage activation ability (%) which makes 100% macrophage activation ability of LPS when making the amount of TNF production of a macrophage into the maximum constant weight is expressed. When drawing the sigmoid curve which expresses the rim lath test positivity LPS content of the LPS with an axis of abscissa by the logarithmic scale, The growth accelerator for animals containing at least one sort of LPS whose rim lath test positivity LPS contents which give ED50 of macrophage activation ability are 0.4 · 100ng / culture medium ml.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to a growth accelerator and the growth accelerator for animals. This invention relates to the growth accelerator and the growth accelerator for animals containing LPS more at a detail.

[0002]

[Description of the Prior Art] In the case of human being, it is usually that the weight at the time of birth is nursed under a special nursing system in a less than 2,500g thing until a premature baby, a call, and weight are set to 2,500g or more. This is because it is easy to cause illness with them and there are many problems also in subsequent growth, so that the birth weight is small. [ the high or death rate in an infancy, and ] [ various ] (\*\* "childcare complete works", such as Munehiro etc. Hirayama, 126·128 pages, the Showa 52 Shakai Hoken Shuppan-Sha issue) About a lean figure person, the rate of hospitalization has the report of being easy to break lean figure persons with most lean figure persons from a pycnic type regardless of an age group with a high mortality ratio by his twenties again more nearly intentionally than a standard person and a pycnic type. (The Morikawa \*\*\*\* etc. becoming thin as a work "overweight child 24· child", 30 pages, February 28, Showa 58 Gyosei Issue) The above-mentioned situation is presumed to be the same even if the differences of extent are that and just the animal that is essentially except human being. In addition, in the case of the cow with which a meal of human being is presented, a pig, a fish, etc., commodity value is decided by the growth situation, and operating efficiency becomes good, so that a training period is short. Thus, at the time of birth, it also sets after that and the need for promotion of growth sometimes arises in the animal of human being and others. Although current and this growth are having achievement mainly meant by the increment in a nutritional intake, if those of a poor appetite are forced into intake, appetite will be injured on the contrary and a desirable result will not be obtained. Moreover, there is individual difference in intake effectiveness. Therefore, in the animals, for example, the fattening cow, other than human being, the hormone drug and the non-hormone drug are given as a growth accelerator, and it also has the intention of achievement of the effectiveness of reducing feed in this case. However, as for the hormone drug, use is withhold from the point of a side effect and a residual property in the living body, and, as for the non-hormone drug, the part is commercialized. (Work "revision and the 2nd edition of the beef cattle feeding whole course", such as Heishiro etc. Tsuchiya, 179-181 pages, the Showa 63 Rural Culture Association issue) Therefore, the request of growth accelerator development as a means to recover the healthy body of the animal of human being and others, and to maintain, and a means to offer meat more economically exist, and there be neither a side effect nor a problem of a residual property in the living body, and it be cheap and wait for development of drugs with a simple medication method strongly.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] This invention makes it a technical technical problem to offer a new growth accelerator and the growth accelerator for animals.

[0004]

[Means for Solving the Problem] the growth facilitatory effect excellent in said technical technical problem -- having -- a premature baby's birth -- preventing -- a side effect and the problem of a residual property in the living body -- there is nothing -- long-term use -- possible -- a production cost -- cheap -- moreover -- taking orally, transderma, dipping, and injection -- it is attained by offering the growth accelerator and the growth accelerator for animals which can be prescribed for the patient in any path and which contain LPS which can be supplied in large quantities. Macrophage activation ability of LPS which activates the TNF production ability of the macrophage cultivated by in vitro one to this growth accelerator and the growth accelerator for animals is made into an index. The macrophage activation ability which gives the amount of TNF production of the macrophage when not adding the LPS to an axis of ordinate 0%, It is a greatest and fixed value (in other parts of this specification) about the amount of TNF production of a macrophage. When drawing the sigmoid curve which expresses the macrophage activation ability (%) which makes 100% macrophage activation ability of LPS when carrying out for calling it the "maximum constant weight", and expresses the rim lath test positivity LPS content of the LPS with an axis of abscissa by the logarithmic scale, At least one sort of LPS whose rim lath test positivity LPS contents which give ED50 of macrophage activation ability are  $0.4 \cdot 100\text{ng} / \text{culture medium ml}$  is contained. As well as the ability of LPS of this invention to be used for each -- "including at least one sort", unless the application meant is checked, it means that it can be used for arbitration, combining with any matter of further others, combining those two or more sorts here. For example, it can also blend with the so-called nutrient and the so-called others, such as other growth accelerators and a vitamin compound.

[0005] A "macrophage" is a kind of an immunocompetent cell and is the generic name of the large-sized amoeboid cell which is distributed over almost all the tissues of the animal inside of the body, and preys on them and digests a particle-like foreign matter, an old waste cell in the living body, etc. "TNF" is the THE journal OBU biological chemistry (the amount of production increases as the activity of The Journal of Biological Chemistry, 260, 2345-2354-page), and a macrophage increases.) which is the generic name of the neoplasm hindrance factor (Tumor Necrosis Factor) produced by the macrophage, and was published at [1985 year. A "rim lath test" is the endotoxin assay using the king crab corpuscle extract and coloring composition substrate which Levin (Levin) originated in 1968. Especially LPS that can be used as an active ingredient of the growth accelerator of this invention and the growth accelerator for animals does not have the source of extraction, a process, and the purification approach limited. For example, it may be LPS extracted from bacteria or vegetation, or you may be synthetic compounds like synthetic lipid A. In addition, especially in the claim, all the things of the bacteria which adhere [ growth of the source of extraction, preservation, and ] in the process of circulation, and live together, and others are contained, without limiting especially the source of extraction to this specification and the very thing specified by the name. For example, when specified with "Wheat LPS", please understand it as that in which all the things of the bacteria which adhere [ growth of not only LPS extracted from the wheat itself but wheat, preservation, and ] in the process of circulation, and live together, and others are contained. Especially the thing that the example which what was allowed adhesion and coexistence by them inhabits may exist in specific vegetation, an animal, a Mycota living thing, and a lichen community living thing besides what relation called parasitism, symbiot, parasitism, and a commensal is solved as is because it is well known for this industry.

[0006] In order to choose from from LPS which can be used as an active ingredient of the growth accelerator of this invention, and the growth accelerator for animals among these LPS Macrophage activation ability of LPS which activates the TNF production ability of the macrophage cultivated by in vitro one is made into an index. The macrophage activation ability which gives the amount of TNF production of the macrophage when not adding the LPS to an axis of ordinate 0%, The macrophage activation ability (%) which makes 100% macrophage activation ability of LPS when making the amount of TNF production of a macrophage into the maximum constant weight is expressed. When drawing the sigmoid curve which expresses the rim lath test positivity LPS content of the LPS with an axis of abscissa by the logarithmic scale, the rim lath test positivity LPS content which gives ED50 of macrophage activation ability should just choose what is  $0.4 \cdot 100\text{ng} / \text{culture medium ml}$ .

[0007] What can be used as source LPS raw material vegetation of a rim lath test sun plant is illustrated below. In

addition, the \*\* name to which the vegetation indicated on these specifications belongs, and the generic name called the publication of the following reference, and were determined.

Gymnosperms, monocotyledon, Dicotyledoneae, Pteridophyta, and SOU: The publication of "primary color range vegetable Akira Ozu" published from Hokuryukan in Showa 57 (main part) and Showa 58 (sequel) was collated, and affiliation was determined. However, "edible vegetable illustration" by which the "oat" was published from Joshi-Eiyo-Daigaku Shuppanbu in Showa 45, The publication of "new Japan flora \*\*\*\* editing" published from Shibundoh in Showa 58 is collated. "Naked barley" The publication of "the comprehensive food encyclopedia" published from Tokyo Dobunshoin Publishers in Showa 46 is collated. "Job's tears", "crow BISHAKU", "Mondo grass", "curcmae rhizoma", a "silvervine", "Gynostemma pentaphyllum", "Houttuynia", "pepper", "capsici fructus", "anisistellati fructus", A "sour orange", "kudzu", the "Nanking liquorice", "Panax schinseng", "Ledebouriella", "Sinomenium acutum", and "planthopper rear HIRUSUTA" The publication of "primary color range oriental drug grass Akira Ozu" published from Hokuryukan in Showa 63 is collated. An "avocado" The publication of the tropical agrotechnology series No. 15 "the fruits of Brazil" published from Association of Agriculture and Forestry Statistics in Showa 53 is collated. "White radish sprouts" The publication of "primary color garden plants Akira Ozu" published from Hokuryukan in Showa 59 is collated. A "muristicae semen" Collating the publication of "illustration tropical plant collection" published from Hirokawa Publishing in Showa 44, "chlorella" collated the publication of "chlorella specification criteria" which the foundation method man-day book health food association announced publicly in Showa 61, and determined affiliation.

Fungus: The publication of the "primary color Japan new fungus pictorial book" published from Hoikusha Publishing in Showa 62 was collated, and affiliation was determined. However, yeast collated the publication of the "microbiology handbook" published from Gihodo Shuppan Co., Ltd. in Showa 37, and "Cordyceps sinensis Berk" collated the publication of "primary color range oriental drug grass Akira Ozu" shown above, and determined affiliation.

The raw material vegetation which can be used by this invention is vegetation of gymnosperms, monocotyledon, Dicotyledoneae, Pteridophyta, SOU, and a fungus, and these can be used individually, mixing. As gymnosperms, the pine which is the Pinaceae Pinus vegetation can be used, for example. The rice which is the Poaceae rice group vegetation as monocotyledon vegetation, for example, the wheat which is the Poaceae Triticum vegetation, The barley which is the Poaceae Hordeum vegetation, naked barley, \*\*\*\* which is the Poaceae crow \*\*\*\* vegetation, the bear which are an oat and the Poaceae Sasa vegetation -- the job's tears which are bamboo grass and the Poaceae Coix vegetation -- The iris which is the Iridaceae Iris vegetation, the garlic which is the Liliaceae Allium vegetation, Crow BISHAKU which is the asparagus which is the Liliaceae pheasant KAKUSHI group vegetation, the Mondo grass which is the Liliaceae Mondo grass group vegetation, the Japanese ginger which is the Zingiberaceae Zingiber vegetation, the curcmae rhizoma which is the Zingiberaceae curcmae rhizoma group vegetation, and the Araceae pinellia tuber group vegetation can be used. The soybean which is Leguminosae soybean group vegetation as Dicotyledoneae vegetation, Shozu which is Leguminosae Phaseolus vegetation, The broad bean which is Leguminosae Vicia vegetation, the kudzu which is Leguminosae kudzu group vegetation, The Nanking liquorice which is Leguminosae liquorice group vegetation, JAKAIMO which is the Solanaceae Solanum vegetation, The tomato which are capsici fructus and the Solanaceae tomato group vegetation, the capsici fructus which is the Solanaceae capsici fructus group vegetation, Rosaceae -- a loquat -- the loquat which is group vegetation, the peach which is the Rosaceae Prunus vegetation, and the avocado which is the Lauraceae avocado group vegetation -- The walnut which is the Juglandaceae walnut group vegetation, the Japanese pumpkin which is the Cucurbitaceae tow Solanum vegetation, Gynostemma pentaphyllum which is the Cucurbitaceae Gynostemma pentaphyllum group vegetation, the white radish sprouts which are the Brassicaceae Japanese radish group vegetation, The silvervine which is the Actinidiaceae silvervine group vegetation, the Houttuynia which is the Saururaceae Houttuynia group vegetation, The pepper which is Piperaceae pepper group vegetation, the anisistellati fructus which is the department SHIKIMI group vegetation of SHIKIMI, The muristicae semen which is the Myristicaceae muristicae semen group vegetation, the sour orange which is the Rutaceae mandarin orange group vegetation, Planthopper rear HIRUSUTA which is Panax schinseng which is the Araliaceae Panax schinseng group vegetation, Ledebouriella which is the Umbelliferae slowdown SHUNIKOBIA group vegetation, the Sinomenium acutum which is the Menispermaceae Sinomenium acutum group vegetation, and the Rubiaceae key KAZURA group vegetation can be used. As Pteridophyta, the field horsetail which is the Equisetaceae horsetail group vegetation, and the spiral spring

which is the Osmundaceae spiral spring group vegetation can be used, for example. As SOU vegetation, KASSOU vegetation, red SOU vegetation, green algae vegetation, and cyanophyceae vegetation can be used, for example. As KASSOU vegetation, the wakame seaweed which is Laminariaceae wakame seaweed group vegetation, the Fucus vesiculosus which is the Laminariaceae Fucus-vesiculosus group vegetation, and the edible brown algae which are the Sargassaceae edible brown algae group vegetation can be used, for example. As red SOU vegetation, the laver which is the Bangiaceae Porphyra vegetation can be used, for example. As green algae vegetation, the chlorella which is the department Chlorella vegetation of OOSHISUTISU can be used, for example. As fungus vegetation, the Basidiomycetes vegetation and child NOU fungus vegetation can be used, for example. The hackberry which is the shiitake mushroom and the Tricholomataceae Flammulina vegetation which are department Lentinus vegetation of an oyster mushroom as Basidiomycetes vegetation, for example -- my which is the Shimeji mushroom and the department maitake mushrooms group vegetation of octopus UKIN which are a mushroom and the Tricholomataceae Lyophyllum vegetation -- the ear shell which are a mushroom and the Polyporaceae poly PORASU group vegetation -- the mushroom which are a mushroom and the department Agaricus vegetation of the agaric, the Jew's ear which is the department Jew's ear group vegetation of a Jew's ear, and the nameko mushroom which is the department Pholiota vegetation of MOEGITAKE can be used. As child NOU fungus vegetation, the baker's yeast and the yeast for a brewing which are the department Saccharomyces vegetation of end MISETASEA can be used, for example. Others, Saccharomyces which are beer yeast, sake yeast, wine yeast, soy sauce yeast, bean paste yeast, etc. at the yeast for a brewing Much yeast (for example, yeast used for manufacture of whiskey or old alcohol) belonging to SEREVUISHIDO is contained. Moreover, the Cordyceps sinensis Berk which is the department NOMUSHITAKE group vegetation of BAKKAKUKIN can also be used. By the approach described below, it can dissociate and the source LPS of vegetation can be refined.

1) If needed, suitably, suspend raw material vegetation well in distilled water after drying and grinding, a fragment and, and collect supernatant liquid. For example, when raw material vegetation is the seed of cereals, with a testa attached [ whether it breaks simply / after removing a testa /, and ] Or what is necessary is to grind until it becomes the powder of extent with which edible is presented, to add water to the obtained powder, to consider as dispersion liquid, to rinse gently the dough which removes sediment according to standing or centrifugal separation, or adds water to powder, scours and is obtained in a mixer, and just to remove sediment, after stirring. When raw material vegetation is chlorella, after it crushes a cell membrane first and ethanol washing removes the lipophilicity matter, it is good to carry out a water extract. What is necessary is not to restrict especially the conditions in the case of the grain size of the raw material vegetation in the case of this water extract, the temperature of water, acidity or alkalinity, an addition, the rate of stirring, time amount, and centrifugal separation etc., and just to adjust them suitably according to the class of raw material vegetation. Moreover, as for the temperature of extract water, it is desirable that the higher one considers as 50 degrees C or less which does not invite formation of a paste of the starch of actuation contained in raw material vegetation for convenience although there is an inclination for the output of LPS and purity to be high. moreover -- although the addition of water changes with the class of raw material vegetation, and grain size -- the case of a cereals seed -- the rate -- 70 -- w/v % or less is actuation top convenience, when it is about 20-50 w/v% desirably. Furthermore, as for the rate of stirring, it is desirable to consider as the thing of extent which does not cause foam formation. In addition, in the case of a wheat seed, the purity of the rim lath test sun plant LPS of this invention rises by about 30 times even by actuation of this phase, judging from rim lath test activity data. Although a cereals seed is hereafter explained taking the case of the case where it is used as a raw material, if it is this so-called contractor, it is very easy to enforce the approach of referring to the following publications, removing sugar, protein, etc. with which it is contaminated from other vegetation, and collecting the rim lath test positivities LPS by the high grade.

2) What is necessary is to give the supernatant liquid obtained by the above 1 to extra \*\*\*\* according to a conventional method, and just to remove a with a molecular weight of 5000 or less fraction, in order to raise purity further.

3) Suspend the obtained desiccation article in distilled water so that it may become [ ml ] in 50mg /, give centrifugal separation actuation, and collect supernatant liquid.

4) This supernatant liquid is cooled by iced water, and if an acid is added and it is made acidity, precipitate will arise. Under the present circumstances, the acid to be used does not need to be a specific thing, for example, can use a

trichloroacetic acid (TCA is called hereafter), perchloric acid, trifluoroacetic acid, an acetic acid, and dichloroacetic acid.

5) Subsequently, give centrifugal separation actuation, precipitate is collected, and distilled water washes, give centrifugal separation actuation again, and collect precipitate.

6) Suspend precipitate in distilled water, and add alkali until precipitate dissolves. Under the present circumstances, the alkali to be used does not need to be a specific thing, either, for example, a sodium hydroxide, a potassium hydroxide, ammonia, a sodium carbonate, and sodium acetate can be used. Since target LPS will deactivate if basicity becomes larger than pH11 at the time of the dissolution of precipitate, cautions are required.

7) Subsequently, since precipitate will arise if it warms at 37 degrees C, an acid is added further and it is made acidity after adding an acid and being referred to as pH8, give centrifugal separation actuation using the centrifugal separation machine which kept it warm at 37 degrees C. In addition, the acid used in this case does not need to be a specific thing, either.

8) Collect supernatant liquid, ice-cool and give centrifugal separation actuation again at 4 degrees C.

9) Collect supernatant liquid, add alkali, neutralize and condense with an ultrafiltration according to a conventional method. Under the present circumstances, the alkali to be used does not need to be a specific thing, either.

10) Subsequently, give gel filtration according to a conventional method, and collect and combine a rim lath test positivity fraction. as the support for gel filtration -- sephadex (Sephadex) G-75, G-100, sephacryl (Sephacryl) S-200, and sepharose (Sepharese) 6Bf. the above can use by U.S. Pharmacia Corp. (Pharmacia Inc.), Biogel (Biogel) P-100 (toe by U.S. Bio-Rad (Biorad Inc.) yaw pearl HW-50, and HW-55 (Oriental soda industrial company make). If the buffer solution is the thing of pH 3-10, any are sufficient as it. For example, tris · HCl or a phosphate buffer solution can be used.

11) Subsequently, a proteolytic enzyme is added to this fraction, carry out in KYUBEJON at 37 degrees C for 2 hours or more, disassemble residual protein, and condense the obtained enzyme processing liquid with an ultrafiltration according to a conventional method. In addition, for example, V8 protease, a chymotrypsin, a trypsin, and thermolysin are independent, or it can be used for arbitration, combining. [ the proteolytic enzyme used in this case ] As a commercial item, Pronase E (\*\*\*\* chemistry company) and pro tee NESU K (Merck Co.) can be used, for example.

12) Subsequently, give this fraction to an anion-exchange chromatography by the FPLC system of the U.S. Pharmacia manufacture using the mono-Q-sepharose (Sepharese) of a Pharmacia manufacture, and Q-sepharose (Sepharese) according to a conventional method, and obtain a rim lath test positivity fraction.

13) Subsequently, give gel filtration according to a conventional method for demineralization, and collect rim lath test positivity fractions.

By the above actuation, in the case of a wheat seed, about 20% of the original rim lath activity is collected, and the purification preparation of about 95% of purity is obtained. Moreover, compared with the purity at the time of phase 1 termination, it becomes one (in the case of a wheat seed) about 1000 times the purity of this. The rim lath test sun plant LPS obtained by the above approach can be offered in remaining as it is or the form condensed to extent of arbitration. Moreover, in order to raise shelf life, it can also provide as desiccation powder with the means of arbitration, such as freeze drying and spray drying. Each of these is producible with a conventional method.

[0008] Escherichia coli LPS known from the source LPS former of rim lath test positivity bacteria Alcaligenes LPS[Py · EICHI · Graham (P. H.Graham) obtained from RADIOBAKUTA (A. radiobactor), An em, ray · OBURIEN (M. A.O'Brien) collaboration, "ANTO nick Fan RIUVEN hook (Antonicvan Leeuwenhock), vol.34,326-330 page (1968): In other parts of this specification, the sources LPS1, LPS2, and LPS3 of bacteria explained in full detail later on on these specifications besides being], Bordetella pertussis LPS, lipid A, etc. which are called A. RADIOBAKUTA LPS, and those composition LPS correspond. Escherichia coli LPS is marketed from for example, U.S. Difco (Difco). Bordetella pertussis LPS is marketed for example, from the Funakoshi chemical (Japan). Moreover, it can also prepare by the well-known approach given in the following reference, for example from the killed bacteria object of well-known Bordetella pertussis, for example, a \*\*\*\*\* plane 1 bacillus. "journal of work, such as Webster (Webster) "TSUETO . NATSURUFORUSHU (Z. Naturforsch)" of work, such as OBU immunology (Journal of Immunology), 744, and 55(1955); waist FARU (Westphal), 76,148 (1952). Lipid A is marketed from the first chemicals. Three sorts of bacilli which produce above-mentioned \*\*\*\* LPS1, LPS2, and LPS3, respectively are separated from the wheat which



this invention person etc. examined regardless of the place of production and a class. Therefore, it is presumed that it dissociates also from which place of production, the wheat of a class, and its workpiece. The place of production of the wheat flour which checked that this invention person etc. could separate these three sorts of bacteria, and the class are as follows.

Smallness Wheat Powder Name \* \* \* Ground \* \* dark Northern SUPURINGUSU U.S. \*1 and Canadian HOITO The Canada \* \* Hurd Red winter semi hardware U.S. \* \* Australian standard HOITO Australia \* \* HOROSHIRI In order to separate LPS1, LPS2, and LPS3 from the Japanese above-mentioned bacteria "Waist FARU (Westphal) etc. MESOZZO Inn Carbo hydrate chemistry 0 [ Methods ] in Carbohydrate The academic press (AcademicPress) company in vol.V[U.S. New York of Chemistry uses the heat phenol process indicated to 83 pages of issue] in 1965. Further What is necessary is for anion exchange resin just to refine. After suspending a fungus body in distilled water, it stirs with distilled water and the heat phenol of the amount of isochore. Namely, subsequently Centrifugal separation recovers a water layer, give this water layer to dialysis, and a phenol is removed. Condense with an ultrafiltration, obtain a rough LPS fraction, and a conventional method is followed in this fraction. For example, what is necessary is to give an anion-exchange chromatography, and for the FPLC system of a Pharmacia manufacture to refine using the mono-Q-sepharose (Sephacrose) of a Pharmacia manufacture, and Q-sepharose (Sephacrose), and just to desalt further according to a conventional method. By the above actuation, the purification preparation of 96% or more of purity is obtained. the ibis from Seikagaku, Inc. as the detection of the rim lath test positivity LPS in a raw material and content measurement are explained in full detail for the example 1 of the after-mentioned experiment -- it can carry out using the reagent set marketed by name called a SHIKARA-system. Namely, what is necessary is to make raw material vegetation color together with the LS-1 set of this system, and just to make it contrast with the calibration curve which similarly created the strength of the coloring using the Et-2 set of this set. sugar -- a phenol-sulfuric acid method -- [- an em . -- DEYUBOISU (M. Dubois) -- etc. -- work -- analytical -- chemistry (Analytical Chemistry) -- vol. -- 28,350 -- a page -- 1956 -- a year --] -- it is -- protein -- a Lowry method -- [- Ore . -- EICHI . -- Raleigh (O. H.Lowry) -- etc. -- work -- a journal -- OBU -- biological one -- chemistry (Journal of Biological Chemistry) --] -- vol. -- 193 -- 65 -- a page -- 1951 -- a year --] -- having measured --.

[0009] It is a proceeding by KAZU wells (Carswell) that a production precursive (priming) phase and a production initiation (triggering) phase are required in order to make the measuring method animal inside of the body of the capacity for LPS to activate the in vitro TNF production ability of a macrophage produce TNF. OBU National Academy Science OBU It is reported to the U.S.A. [Proceeding of NationalAcademy Science of USA., 72, and 3666-3670 pages (1975)]. The drugs prescribed for the patient for priming phase initiation are "primers" (endogenous TNF production accelerator), and the drugs prescribed for the patient for triggering phase initiation are "triggers" (endogenous TNF production agent). What is necessary is to extract the macrophage abdominal cavity resident cell of a mouse, to add recombination mouse IFN-gamma as a primer to this, to add LPS as a trigger and just to measure the TNF activity subsequently, in order to measure the capacity for LPS to activate the in vitro TNF production ability of a macrophage. TNF activity -- L-929 cell [- proceeding OBU National academy Science OBU ] -- it measures as follows based on the cytotoxicity over U.S.A. 72 and 3666 · 3670-page]. Raise by the eagle minimum essential culture medium (it expresses an MEM culture medium hereafter) which added the calf embryo blood serum 5%, it is made to be contained in the culture medium same as the above whose 8x10<sup>4</sup> cells are 100microl, and the breeding of the L929 cell is carried out on the flat bottom plate of 96 holes. Breeding conditions are 37 degrees C, 2 hours, and 5%CO<sub>2</sub>, and are good by the approach used for the usual cell culture. Then, in addition, the volume of culture medium is set to 150microl so that it may become 1microg [ml] final concentration into a culture medium about actinomycin-D. 50microl Immediately, add what diluted the specimen with the MEM culture medium suitably (the rate of dilution is suitably prepared in this case, and ED50 can be calculated). Furthermore, L929 cell used as the 200micro of the last volume 1 is cultivated on the above-mentioned conditions for 18 hours. In order to measure cell damage activity, all culture media are removed first, subsequently 1% methyl alcohol solution which contains a crystal violet 0.1% is added, and fixed dyeing is carried out. Although a crystal violet dyes all nucleated cells, since a dead cell is removed from a plate base by rinsing after dyeing, cell damage activity can be measured directly from the result of a survival cell. Cell damage activity is measured by measuring the absorbance in OD (590nm) as an index, and measuring whenever [ this dyeing ] with whenever [ to a control group / dyeing ]. The definition of activity is performed as follows. L929 cell asks for the rate of dilution of the specimen which can survive 50% (N). Rabbit TNS la

neoplasm failure blood serum (Tumor Necrosis Serum)] is used as contrast, and the activity n of this rabbit TNS (a unit/ml) is determined using  $2.4 \times 10^6$  unit / mg/ml TNF-alpha (it received from Asahi Chemical Co., Ltd. rearranging Homo sapiens mold TNF). It asks for the rate of dilution (C) which gives ED50 of this rabbit TNS. Specimen activity (a unit/ml) is N/C. x It calculates by n.

[0010] The growth accelerator of manufacture approach this invention of \*\* which can be offered can be offered with the pharmaceutical preparation technique of a conventional method with gestalten, such as powder, a granule, a pill, a tablet, the trochiscus, a capsule, liquids and solutions, patches, an ointment, liniments, lotions, suppositories, injections, and a dipping agent. Moreover, as an object for animals, it can also prepare as a feed additive, premix pharmaceutical preparation, and a drinking water additive further. When considering as a feed additive, considering as powder material or a granule is desirable. Moreover, premix pharmaceutical preparation points out what was diluted with feed components, such as starch, in order to make mixing with feed easy. Any of the feed marketed are sufficient as the feed which can add the growth accelerator of this invention as a feed additive and premix pharmaceutical preparation. Moreover, you may be feed containing feed additives, such as a mineral, a vitamin, and amino acid. If it is a request, in order to hold shelf life and homogeneity, additives, such as an excipient, a preservative, and a buffer, can also be added to these pharmaceutical preparation with a conventional method. Furthermore, corrigent, an odor masking agent, and a coloring agent can also be included. As an excipient, a lactose and starch can be used, for example. As a preservative, p-hydroxybenzoic esters, such as methyl parahydroxybenzoate, ethyl p-hydroxybenzoate, and propyl parahydroxybenzoate, sodium dehydroacetate, a phenol, the methylparaben, ethylparaben, propylparaben, etc. can be used, for example. As a buffer, citrate, acetate, phosphate, etc. can be used, for example.

[0011] The mouse was medicated with the growth facilitatory effect of check this invention of a growth facilitatory effect, and it was checked by investigating the gain-of-body-weight effectiveness. Hereafter, an example, the example of manufacture, and the example of an experiment explain this invention to a detail further. in addition, "Escherichia coli LPS" used by them -- the U.S. Difco (Difco) make -- it is 0128-B8.

[0012] The example 1 (manufacture of Wheat LPS) of manufacture

1) The hard wheat powder (hard let spring from the United States or Canada) (3,120g) containing 1.09% of ash content was put into the small kneader, 2.03l. distilled water was added, and it scoured for 10 minutes, and considered as dough. 10l. water was added after the standing for 15 minutes, it stirred gently, the starch milky lotion was probed, and elution of the fusibility component was carried out to coincidence. After putting this eluate all over a 5-degree C refrigerator for 12 hours, the sedimentation sections, such as starch, were removed. Supernatant liquid was freeze-dried and 201.1g powder was obtained (powder A). Furthermore, 5l. distilled water was added to residual dough, and it stirred gently, it processed like the above hereafter, and 40.1g powder was obtained (powder B).

2) It is [temperature of 5-10 degrees C which presented ultrafiltration machine HF-Lab 1 by U.S. Amicon with these powder A and B, attached hollow system cartridge HF-Lab 1PM5 about the molecular-weight fraction 5,000, attached hollow system cartridge HF-Lab 1PM10 about the molecular-weight fraction 10,000, and performed the ultrafiltration. Inlet pressure 25psi (1.76kg/cm2), \*\*\*\*15psi(1.06kg/cm2)]. Based on the result, each part was named as follows.

A with a molecular weight of 5,000 or less part Powder A : a1 It is a with a molecular weight of 5,000 or more part a2 A with a molecular weight of 5,000 or less part Powder B : [ b1 ] It is a with a molecular weight of 5,000 or more part b2 A with a molecular weight of 10,000 or less part Powder A : [ a3 ] It is a with a molecular weight of 10,000 or more part a4 A with a molecular weight of 10,000 or less part Powder B : [ b3 ] It is a with a molecular weight of 10,000 or more part b4 Although a lot of rim lath test positivity components exist in a with a molecular weight of 5,000 or more fraction if each [ these ] fraction is given to a rim lath test based on the approach of explaining in full detail for the example 1 of the after-mentioned experiment Hardly existing in a with a molecular weight of 5,000 or less fraction was checked.

3) After having put 30g of the above-mentioned powder a2 into the 1l. Erlenmeyer flask, pouring out 600ml distilled water and stirring with a stirrer for 60 minutes, centrifugal separation actuation (10,000Gx 10 minutes) was given at 4 degrees C by Hitachi cooling supercentrifuge SCR-20B (the rotor RPR16 was cooled at 4 degrees C in advance), and supernatant liquid was collected.

4) This supernatant liquid was put into the 1l. Erlenmeyer flask, and stirring with a stirrer under (about 2 degrees C of solution temperature) ice-cooling, 20.5ml of 100%TCA water solutions cooled at 2 degrees C in advance was

dropped, and it was left for 10 minutes in after [ dropping termination ] iced water.

5) Subsequently, centrifugal separation actuation (10,000Gx 10 minutes) was given at 4 degrees C like the above, precipitate was collected, and in iced water, it put into the 500ml beaker, suspended with 300ml distilled water under cooling, and cooled in iced water, centrifugal separation actuation (10,000Gx 10 minutes) was given at 4 degrees C like the above, and precipitate was collected.

6) This precipitate was put into the 1l. beaker, and it suspended by 500ml of distilled water, and neutralized using about 3.5ml of 1-N sodium-hydroxide solutions (pH7), and subsequently, cooling in iced water, as about 2ml of 1-N sodium-hydroxide solutions was added and it became 0.02-N sodium-hydroxide solution, precipitate was dissolved.

7) After having added about 1.5ml of 1N hydrochloric acids, being referred to as pH8 and adding 100ml distilled water subsequently, it moved to the 1l. Erlenmeyer flask, and shook slowly for 30 minutes within the 37-degree C incubator.

8) After adding 30ml of 100%TCA water solutions, mixing and shaking slowly for 10 minutes within the 37-degree C incubator, centrifugal separation actuation (3,000Gx 10 minutes) was given using centrifugal separation machine Tommy CD100R (Tomy Precision Machinery Co., Ltd. make) which kept it warm at about 37 degrees C.

9) Supernatant liquid was collected, it ice-cooled and centrifugal separation actuation (10,000Gx 10 minutes) was given at 4 degrees C.

10) Supernatant liquid was collected, about 3.6ml of 10-N sodium-hydroxide solutions neutralized, and it was referred to as pH7, and condensed with the ultrafilter (Toyo Roshi UHP-150, filter:UK-10, N2 \*\*: 4.0kg/cm2).

11) The sepharose (Sepharose) 6B column [the U.S. Pharmacia Corp. (Pharmacia Inc.) make and column size:5cm(bore) x100cm (2l.)] was used, 60ml of obtained concentration liquid was given to gel filtration [buffer solution:10mM tris-HCl / 10mMNaCl (pH7.5), and rate-of-flow:60ml/o'clock], and it obtained the 20ml fraction each.

12) 280ml of fractions from the 43rd to [ from the start ] No. 56 \*\* was combined, and pronase E(\*\*\*\* chemistry company) 450microg was added, and the bottom of a shaking, and after keeping it warm at 37 degrees C for 2 hours, it condensed with the ultrafilter (Toyo Roshi UHP-62, filter:UK-10, N2 \*\*: 4.0kg/cm2). Subsequently, the anion-exchange chromatography was given using the Pharmacia manufacture FPLC system (column: monochrome QHR 10/10). Namely, 10mM tris - After giving a sample to a column with the buffer solution containing HCl (pH7.5) and NaCl of 10mM(s), the column was washed with the buffer solution (200ml) in which the amount of NaCl(s) has the presentation increased to 165mM(s) with the above-mentioned buffer solution. Subsequently, elution of the purpose LPS was carried out in the 400ml of whole quantity, making NaCl concentration increase so that it may become the NaCl concentration gradient of 1M from 165mM, and it collected 2ml fractions each. After applying the concentration gradient by which the rim lath test positivity was checked, the 5-8th fractions are combined and it is 8ml[LPS:3.03mg (it is the rim lath test positivity LPS reduced property measured by the approach of example of the after-mentioned experiment 1 publication.) of about 92% of LPS purity. Sugar all whose following amounts of LPS are also this reduced property: 0.23mg and protein:0.04mg] were collected.

13) Subsequently, the 8ml was given to gel filtration (buffer solution:water) using sephadex (Sephadex) [column:2.0cm(bore) x20.2cm (66ml)] G-25, and it collected 3ml fractions each. The 9-12th fractions by which the rim lath test positivity was checked were combined, and 12ml (LPS:2.7mg, sugar:0.18mg, protein:0.03mg) of about 95% of LPS purity was collected. In addition, this fraction checked that it was acidity with the anion-exchange chromatography.

14) The above-mentioned fraction was freeze-dried until it became constant weight after freezing at -80 degrees C, and when measuring weight, there was 0.75mg. (This freeze-drying preparation is hereafter called Wheat LPS) Since it is equivalent to 2.7mg when measuring the rim lath activity of this wheat LPS by the approach of example of the after-mentioned experiment 1 publication, it is that specific activity. It is set to  $2.7/0.75=3.6$ . Moreover, since it is thought that the independent sugar which may exist as impurity was altogether removed by the above purification on parenchyma, all the detected sugar is considered to be sugar which constitutes Wheat LPS. therefore -- if the purity of the wheat LPS in this phase is calculated based on weight -- protein =  $0.03\text{mg}/2.7\text{mg}$  LPS =  $0.75/0.03=0.72\text{mg}$  -- therefore --  $0.72/0.75 \times 100=96$  (%)

It comes out.

[0013] The physical-properties 15 molecular-weight wheat LPS of Wheat LPS was dissolved in distilled water 1mg

[ml] solution was prepared, and the 4microl was put into the 1.5ml TOREFU tube. Separately, 1microl of 1 SDS processing liquid I which added and prepared 2.5%SDS, 5% mercaptoethanol, and 10mM tris hydrochloric acid (pH8.0) to EDTA of mM was added to this, and this mixture was dipped in it for 3 minutes at the boiling water. The fast system (Phast System) of a Pharmacia manufacture is used. Between electrodes SDS-buffer The above-mentioned mixture which is 1microl between which it was placed by the strip (BufferStrip) (Pharmacia manufacture) is made into gel [the fast gel gradient (Phast Gel Gradient 8-25) of a Pharmacia manufacture] with \*\*. It set to maximum electrical potential-difference 250v and 10mA of maximum current, and migration was made to start (this migrating method is called SDS-1 law on these specifications). The behavior in Coomassie dyeing and the argmentation was observed after migration termination. In Coomassie dyeing, a Pharmacia manufacture is fast 0.1% as a stain solution. As decolorization liquid, methanol:acetic acid:distilled water (capacity factor 3:1:6) mixture was used, and the gel blue (Phast Gel Blue) R was dyed and decolorized in the following order.

It protects in the indirect desulfurization color of 3:50 degrees C at 2:50 degrees C of dyeing for 8 minutes for 5 minutes, and protects for 5 minutes in the indirect desulfurization color of 5:50 degrees C by 4:50 degrees C of dyeing for 8 minutes by 1:50 degrees C for 10 minutes (glycerol, an acetic acid, capacity factor 5:10:85 mixture of distilled water).

6: The desiccation argmentation was performed in the following order.

By 2:50 degrees C of processings for 2 minutes at 1:50 degrees C at a penetrant remover (ethanol, an acetic acid, capacity factor 5:1:4 mixture of distilled water) For 2 minutes, By the penetrant remover (ethanol, an acetic acid, capacity factor 10:5:85 mixture of distilled water), by 3:50 degrees C of processings For 4 minutes, By the penetrant remover (ethanol, an acetic acid, capacity factor 10:5:85 mixture of distilled water), by 4:50 degrees C of processings For 6 minutes, With sensitization liquid (8.3% glutardialdehyde), at 5:50 degrees C of processings For 3 minutes, By the penetrant remover (ethanol, an acetic acid, capacity factor 10:5:85 mixture of distilled water), by 6:50 degrees C of processings For 5 minutes, By the penetrant remover (ethanol, an acetic acid, capacity factor 10:5:85 mixture of distilled water), by 7:50 degrees C of processings For 2 minutes, At 9:40 degrees C of processings for 2 minutes by 8:50 degrees C of processings by the penetrant remover (deionized water) at a penetrant remover (deionized water) For 13 minutes, At 11:30 degrees C of processings for 30 seconds by 10:30 degrees C of processings with a 0.25 w/v% silver nitrate at a penetrant remover (deionized water) For 30 seconds, By 13:30 degrees C of processings for 30 seconds with 12:30 degrees C of processings with a developer (0.04 v/v% formaldehyde +2.5 w/v% sodium carbonate penetrant remover) For 4 minutes, [ with a penetrant remover (deionized water) ] With a developer (0.04 v/v% formaldehyde +2.5 w/v% sodium carbonate penetrant remover), at 14:50 degrees C of processings For 2 minutes, Although the processing 16-desiccation LPS dyes in 3 minutes at 15:50 degrees C of processings and it is dyed the argmentation in the reaction stop solution (5% [ v/v] acetic acid) with protection liquid (an acetic acid, glycerol, capacity factor 10:8:85 mixture of distilled water) When observing the dyeing band using the property in which it is not dyed Coomassie dyeing, the main dyeing band of Wheat LPS was detected in the location of molecular weight 8,000\*\*1,000. Separately, Wheat LPS was dissolved in distilled water, 2mg [ml] solution was prepared, and the 10microl was put into 1.5ml \*\* plastic tube. to this, separately, 10microl of SDS processing liquid I which added and prepared 10%(w/v) SDS of 180microl, the 5%beta-mercaptoethanol of 45microl, the CBB coloring matter solution of 90microl, the 0.5M tris hydrochloric acid (pH6.8) of 112.5microl, and distilled water of 22.5microl could be added, and it mixed, subsequently to under an ebullition water bath, dipped for 5 minutes, and dipped and quenched in iced water immediately after this heating. The migration buffer solution which dissolved 10ml 10%(w/v) SDS, 17.9g fricin, and 3.03g tris in 1l. distilled water, and was prepared was put into the slab-gel-electrophoresis tub by Mari Sol. Polyacrylamide gel was fixed to the migration tub 20%, the specimen was put into the sample slot, subsequently to 150v the electrical potential difference was fixed to 50v for 1 hour, and migration was continued until coloring matter was eluted from gel (in this specification, this migrating method is called SDS-2 law). After migration termination, the argmentation was performed at the room temperature using the argmentation kit 161-0443 of Bio-Rad, and behavior was checked. The main dyeing band of Wheat LPS was detected in a result, molecular weight 8,000\*\*1,000, and the location of 5,000\*\*2,000. In addition, the amount marker of protein molecules which made Wheat LPS and coincidence migrate by SDS-1 law and SDS-2 law The LMW kit Elphosphorylase b of a Pharmacia manufacture (94k), Albumin (67k), ovalbumin (43k), carbo nick ANHITORAZE (30k), Trypsin-inhibitor (20k) and alpha-lactalbumin (14k)] and a peptide molecular weight marker It was the 1860-101 molecular weight marker [a myoglobin (16.9k),

myoglobin I&II (14.4k), Myoglobin I (8.2k), Myoglobin II (6.0k), and Myoglobin IV (2.5k)] of a Pharmacia manufacture.

16) Lynn content chain-TORIBARA (Chen-Toribara) -- law [-- work, such as a chain, "analytical chemistry (Analytical Chemistry), vol.28, and 1756-1758 pages (1956) -- being based -- a degree -- it went to pass. Wheat LPS was dissolved in distilled water, the solution of 20microl containing the wheat LPS of 25microg was prepared, and it put into the small test tube. The 50 v/v% sulfuric acid of 20microl was added, and it heated at 160 degrees C for 2 hours. Subsequently, after adding the 10 v/v% perchloric acid of 20microl, it heated for 1 minute and was made to ash with a gas burner. After that, 0.5ml distilled water and after adding the 0.5ml reaction reagent (1ml 6-N sulfuric acid, 2ml distilled water, a 2ml 2.5 v/w% ammonium molybdate, and 1ml 10 v/w% of ascorbic acid are mixed and prepared, and the 0.5ml is used) subsequently and leaving it for 30 minutes at a room temperature, the absorbance (OD820nm) in 820nm was measured. In addition, as a sample for calibration-curve production, the potassium dihydrogenphosphate (Wako Pure Chem make) was diluted with distilled water, and the 0.5ml solution which contains 2.5microg, 1microg, 0.25microg, and 0microg as Lynn weight, respectively was prepared and used. In addition, it is equivalent to 4.39g of potassium dihydrogenphosphates Lynn 1g. The obtained result is shown in Table 1.

[0014]

[Table 1]

OD <sub>820nm</sub>	検 体
	リン酸二水素カリウム (リン換算値: $\mu g$ )
0.002	0
0.150	0.25
0.620	1.0
1.559	2.5
	小麦LPS (4検体) (検量線から計算した リンの重量: $\mu g$ )
0.036	0.1
0.073	0.2
0.104	0.3
0.139	0.4

[0015] In Table 1, the data of Wheat LPS are the value which reduced the data of the contrast which has not heat-treated, in order to avoid the error by mixing (for example, it originates in a phosphate buffer solution) of inorganic phosphorus. It will be set to 1.4, if the molecular weight of Wheat LPS is assumed to be 8,000 and the number of Lynn per the molecule is calculated by the degree type based on the result of an upper table.

[0016]

[Equation 1]

$$\text{リン重量} \times 10^{-6} \times \frac{\text{分子量}}{25 \times 10^{-6}} \times \frac{1}{32}$$

[0017] As 1-4, and one of the causes of changing, the number of Lynn is mono-FOSUFO esterase mixing in a purification phase in the above-mentioned experiment, and it is also considered that the phosphoric acid \*\*\*\*ed.

17) hexosamine content Elson-Morgan (Elson-Morgan) -- law (377-379 pages of Tokyo Kagaku Dojin publication "biochemistry experiment lecture" No.4) -- being based -- a degree -- it went to pass. Wheat LPS was dissolved in distilled water, the 1mg [ml] solution was prepared, the 100microl was put into the spitz with a screw cap (Iwaki glass company make), 8NHCl(s) of 100microl were added to this, and it heated at 110 degrees C for 16 hours. About 200microl addition of 4NNaOH(s) was done, and it was referred to as pH7. After having isolated the 100microl preparatively, putting into another spitz with a screw cap and adding the following reagent A of 200microl, it heated at 105 degrees C for 1.5 hours, and, subsequently cooled with the stream. Subsequently, 100microl was isolated preparatively, 96% ethanol of 670microl was added, and further, after adding the following reagent B of 67microl, it was left at the room temperature for 1 hour, and the absorbance was measured by 535nm. As a sample for calibration:curve production, it is 0.20-200microg [ml] N-acetyl. The glucosamine (Wako Pure Chem make) was used. (A) Reagent) The acetylacetone of 75microl and 2.5ml 1.25-N sodium carbonate are mixed and prepared. (B) Reagent) 30ml 96% ethanol is mixed with 1.6g p-dimethyl benzaldehyde and 30ml concentrated hydrochloric acid, and it prepares.

The result and the number of hexosamines of Wheat LPS were 6\*\*2-/molecules (assumption molecular weight 8,000). 18) The internal standard (margaric acid of 0.55mM) of 10microl was added to the wheat LPS distilled water solution (1mg/(ml)) with a fatty-acid content [1] of 90micro. 0.5M 1.0ml sodium methylate was added, and hydrolysis and esterification of fatty acid ester were performed. At the room temperature, after 1-hour neglect, 0.5NHCl(s) of 960microl were added and it neutralized. The 2ml hexane was added to this and it stirred violently for 15 minutes. Subsequently, at long-intervals alignment separation was performed by 1,000g for 5 minutes, and the hexane layer was isolated preparatively. The hexane was evaporated with nitrogen gas, and it condensed until it was set to about 20microl. this sample -- gas-chromatography [- body: -- Shimazu GC8APF and the Spelco (Spelco) make of capillary column:Canada -- FSCAP Sp2330 and carrier gas:nitrogen] were given and the amount of fatty acids was measured. As criteria of the amount measurement of fatty acids, coliform LA-15-PP (it is molecular weight 2,000 and it is known that the number of fatty acids in 1 molecule is 6) which is synthetic lipid A by the first chemicals company was used. It was presumed that a result and the number of fatty acids of Wheat LPS were 6\*\*2-/molecules (assumption molecular weight 8,000). The chart observed with the above-mentioned gas chromatography is shown in attached drawing 1 - drawing 3. Drawing 1 is [ drawing 3 of Escherichia coli LPS of drawing 2 of Wheat LPS ] the chart of Bordetella pertussis LPS. In drawing 1 - drawing 3, the holding time (minute) corresponding to the main peak number currently illustrated was as follows.

図 1 :	ピーク番号	保持時間 (分)
	1	2. 4 5 0
	2	2. 7 5 8
図 2 :	ピーク番号	保持時間 (分)
	1	2. 4 1 7
	2	2. 7 4 2
図 3 :	ピーク番号	保持時間 (分)
	1	2. 4 3 3
	2	3. 0 2 8

It is clear to differ from the thing of Bordetella pertussis LPS greatly by the comparison of drawing 1 - drawing 3, although the chart of Wheat LPS resembles the chart of Escherichia coli LPS.

19) a KDO content KDO (2-keto-3-deoxy oct NETO) content -- the diphenylamine method [work, analytical BAIOKEMU (Analytical Biochem.), 58 (1), and 123-129 pages (1974), such as a SHABI R (Shaby R.),] -- being based -- a degree -- it went to pass. A 500mg diphenylamine, 5ml ethanol, a 45ml glacial acetic acid, and 50ml concentrated hydrochloric acid (all Wako Pure Chem make) were doubled, and the KDO detection reagent was prepared. 250micro of distilled water l which contains the 1.05mg [ml] wheat LPS in the 500microl was set, and it was [ 100-degree C ebullition ] under water bath, and cooled for 30 minutes in cold water (23 degrees C) after heating for 30 minutes, and,

subsequently 420, 470, and the ultraviolet-region absorption by 630 or 650nm were measured using the Hitachi spectrophotometer 320 (measured value is set to A420, A470, A630, and A650, respectively). As a standard sample, 250micro of distilled water l containing 127microg /ml ] KDO ammonium salt [the U.S. sigma (Sigma) company make] was used. The value of a degree type was calculated about a specimen sample and each standard sample. Value of a S=A420-A470+A630-A650 specimen sample The value (Ss) of (ST) of 0.379 and a standard sample was 0.294. It was presumed by the comparison of this value that KDO of 5 \*\*one mol /, and molecular weight 8000 was contained in Wheat LPS.

[0018] The example 2 (manufacture of Chlorella LPS) of manufacture

1) Cell membrane crushing chlorella (product made from incorporated company mannan foods) 30g was washed by ethanol until a penetrant remover stopped having colored green.

2) 26g of this washing residue was melted to distilled water by the concentration of 100mg/ml, and centrifugal separation actuation (4 degrees C, 10,000Gx 30 minutes) was given after the 2-hour shaking at 45 degrees C.

3) Supernatant liquid was collected, it filtered by Toyo Roshi No.2, and, subsequently distilled water extracted.

4) 290ml of extracts was given to the anion-exchange chromatography on the following conditions.

Column: Q-sepharose (phi3cmx23cm, capacity of about 180ml)

buffer: -- 10mM tris-HCl (pH7.5) and NaCl concentration gradient: -- 310ml of fractions which carried out 1M rate-of-flow:100-200ml / [ / o'clock temperature:room temperature 5 bypassing was processed by glucoamylase 400 mM 10 mM, and starch was decomposed (pH5.0, 40 degrees C, about 2 hours). Decomposition of starch was checked when coloring did not arise at an iodine starch reaction.

6) Centrifugal separation (10,000Gx 10 minutes) was given, and supernatant liquid was collected, and 10NNaOH solutions neutralized, it was referred to as pH7, the ultrafiltration was carried out using the ultra filter which has the pore size of molecular weight 200,000 cut, and removal and concentration of a decomposition product were performed.

7) 30ml of obtained concentration liquid was given to the anion-exchange chromatography using the Pharmacia manufacture FPLC system (column: monochrome QHR 10/10). Namely, 10mM tris - After giving a sample to a column with the buffer solution (pH7.5) containing HCl and NaCl of 10mM(s), the column was washed with the liquid (200ml) to which the amount of NaCl(s) carried out the presentation increased to 165mM(s) with the above-mentioned buffer solution. Subsequently, since the purpose LPS was eluted, the column was washed in the 400ml of whole quantity, making NaCl concentration increase so that it may become the NaCl concentration gradient of 1M from 165mM, and it collected 2ml fractions each. After applying the concentration gradient by which the rim lath test positivity was checked, the 5-8th fractions were combined.

8) Subsequently, the 8ml was given to gel filtration (buffer solution:water) using sephadex (Sephadex) [column:2.0cm(bore) x20.2cm (66ml)] G-25, and it collected 3ml fractions each. The 9-12th fractions by which the rim lath test positivity was checked were combined, and 12ml was collected (LPS:14.3mg, sugar:2.0mg, protein: 0.53mg). LPS was measured by the approach of example of the after-mentioned experiment 1 publication.

9) The above-mentioned fraction was freeze-dried until it became constant weight after freezing at -80 degrees C, and when measuring weight, there was 5.8mg. (This freeze-drying preparation is hereafter called Chlorella LPS) Since the rim lath activity of this chlorella LPS is equivalent to 14.3mg, that specific activity is set to 14.3/5.8=2.5. Moreover, since it is thought that the independent sugar which may exist as impurity by the above purification was altogether removed on parenchyma, all the detected sugar is considered to be sugar which constitutes Chlorella LPS. therefore -- if the purity of the chlorella LPS in this phase is calculated based on weight -- protein=0.53mgLPS=5.8-0.53=5.27mg it is -- since -- 5.27/5.8x -- it is 100= 91 (%).

The following value was acquired like the approach of a publication by the example 1 of physical-properties manufacture of Chlorella LPS. Molecular weight was measured by SDS-2 law.

main -- number of molecular weight =40,000 · 90,000 Lynn = -- number of 4\*\*1-/molecular weight 10,000 hexosamines = -- the number of \*\*1-/molecular weight 10,000 fatty acids -- the =6\*\*1-/molecular weight 10,000 -- the KDO number =2\*\*1-/molecular weight 10,000 [0019] The example 3 (manufacture of Bordetella pertussis LPS) of manufacture

The Bordetella pertussis liquid for a trial (a 2.0x10<sup>10</sup> cell / ml) which came to hand from the Chiba blood serum lab was used as a killed bacteria object. The above-mentioned killed bacteria object was suspended in sterilized water so that it might be set to 25mg (dry weight)/ml. Equivalent 90% heat phenol liquid (68-70 degrees C) was added to this.

and it extracted, shaking at 68 degrees C for 1 hour. At long-intervals alignment separation was carried out at 8,000G and 4 degrees C for 20 minutes, and the water layer was isolated preparatively. The above-mentioned water layer and equivalent sterilized water were added to the remaining phenol layers, and the same extract was performed. The obtained water layer -- a previous water layer -- doubling -- a stream -- it condensed to 1/10 by the rotary evaporator after dialysis in inside overnight. At long-intervals alignment separation of this was carried out at 8,000G and 4 degrees C for 20 minutes. Supernatant liquid was isolated preparatively and cold ethanol (little \*\*\*\* and 0-4 degrees C) was left for sodium acetate at an amount, in addition -20 degrees C 6 times overnight. Subsequently, 4,000G and the precipitate which carried out at long-intervals alignment separation for 30 minutes and which was collected at 4 degrees C were washed twice centrifugally once with the acetone by ethanol, and was dried with the aspirator. The residue was suspended in distilled water so that it might become in ml and 20mg /, and it was given to sonication (output control 5 or 15 minutes, room temperature) with the SONIFAL185 mold by U.S. Branson (Branson). Subsequently, at long-intervals alignment separation was carried out at 2,500G and 4 degrees C for 10 minutes, and supernatant liquid was isolated preparatively. At 4 degrees C, it is nuclease DNaseI and RNase by the U.S. sigma (Sigma) company about this supernatant liquid. It processed by A for 15 to 16 hours (finally 10microg /ml) DNase I and 20microg /ml) RNase A were used). Furthermore, the nuclease of the same concentration was added and it warmed at 37 degrees C for 2 hours. Subsequently, at long-intervals alignment separation was carried out at 2,500G and 4 degrees C for 10 minutes, and supernatant liquid was isolated preparatively. The Acrodisk (Acrodisc) of the U.S. germane (Gelman) company was used, and this supernatant liquid was filtered by 0.2 micrometers of apertures. Filtrate is covered over molecular sieving. Sepharose (Sephacrose) by [resin:U.S. Pharmacia (Pharmacia) 6B, Column size = bore [ of 5cm ] x die length of 100cm, tris of buffer-solution =10mM · HCl, The rim lath activity positivity fraction was investigated and doubled using LS-1 kit by NaCl (pH7.5) of 10mM(s), rate-of-flow =about 3 ml/cm2/o'clock], and Seikagaku, the Acrodisk of the above-mentioned germane company was used, and it filtered by 0.2 micrometers of apertures. Filtrate is covered over the ion exchange. FPLC by [equipment:U.S. Pharmacia (Pharmacia), Resin: The U.S. Pharmacia manufacture monochrome Q It washes for 15 minutes by NaCl of tris:HCl+10mM of HR 10/10 and buffer-solution =10mM (pH7.5). Subsequently The amount of NaCl(s) is increased to 165mM(s), and it washes for 30 minutes, and it washes, making the amount of NaCl(s) increase over 20 minutes, so that the amount of NaCl(s) may consist of 165mM(s) subsequently to the concentration gradient of 1M. Subsequently The rim lath activity positivity fraction was investigated and doubled using LS-1 kit by] and Seikagaku by rate-of-flow =2ml/washed for 30 minutes by NaCl of 1M. the doubled fraction -- a column -- desalting -- [resin:bore [ sephadex / by U.S. Pharmacia (Pharmacia) / G-25 fine (fine), and column size = / of 2cm ] x die length of 25cm, and eluate = distilled water] -- subsequently it freeze-dried. The highest matter of possibility of being mixed in this freeze-drying preparation (4.50mg) is a nucleic acid. Then, the ultraviolet absorption curve (200-400nm) was taken, and it asked for the absorbance in 260nm. When computing nucleic acid concentration from the above-mentioned absorbance using the nucleic acid concentration at the time of an absorbance 1 being 50microg/ml, it was 1% or less. Moreover, protein was clearly detected by neither SDS-1 law nor SDS-2 law. Therefore, consideration of detection sensitivity presumes the protein currently mixed in the above-mentioned freeze-drying preparation to be at most 0 - 3%. Therefore, the purity of the above-mentioned freeze-drying preparation was presumed to be 96% or more. The physical properties of this Bordetella pertussis LPS measured like the approach of a publication by the example 1 of manufacture were as follows. Molecular weight was measured by SDS-2 law.

physical-properties main molecular weight [ of Bordetella pertussis LPS ] = -- number of 6,000\*\*1,000 Lynn = -- number of 4-/molecular weight 6000 hexosamines = -- the number of 12-/molecular weight 6000 fatty acids -- the =4/molecular weight 6000 -- the KDO number =2\*\*1/molecular weight 6000 [0020] in addition, Escherichia coli LPS[measured like the approach of a publication by the example 1 of manufacture -- the physical properties of Oby U.S. Difco (Difco)128:B8] were as follows. Molecular weight was measured by SDS-2 law.

physical-properties main molecular weight =40,000\*\*of Escherichia coli LPS -- 10, 0008, and 000\*\* -- number of number of 4,000 Lynn =12-/molecular weight 30,000 hexosamines =45\*\*6-/molecular weight -- the number of 30,000 fatty acids =18-/molecular weight 30,000KDO number =5\*\*1-/molecular weight 30,000 [0021] The example 4 (manufacture of LPS1, LPS2, and LPS3) of manufacture

1) Weighing capacity of the 1.04g (1 and Canadian HOITO from Canada) of the hard wheat powder containing 1.09% of ash content was carried out to 50ml \*\* Corning tube, it was put into it, 20ml distilled water was added, and 50mg



[/ml] wheat flour liquid was prepared.

It is [ 37-degree C ] under water bath, and shaking culture of this liquid is carried out. 2) After [ culture initiation ] 0 hour, 1 hour, 2 hours, 3 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 10 hours, 12 hours, 20 hours, 0.5ml was extracted in every 45th hour, it diluted 10 degrees · 105 times, addressing to 100microl was wound around the standard agar medium (culture medium with the following presentation by NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.), and measurement of the number of micro organisms and observation of a colony were performed for 24 hours.

Standard agar medium (NISSUI PHARMACEUTICAL [ CO., LTD. ] code number: 05618) Inside of 1l. Yeast extract 2.5g A peptone 5.0g Grape sugar 1.0g Agar 15.0g pH The culture elapsed time 8 hour it was thought that 7.1 \*\*0.13 classes differed The yellow accepted in the 10th hour · a cream opaque colony (colony 1), A cream opaque colony (colony 2), a yellow translucent colony (colony 3), an opalescence opaque colony (colony 4) and white · the opaque small colony (colony 5) was wound around another standard agar medium of the above and congener, was planted, and was inherited, and the Gram's stain nature of the bacteria of colonies 1-5 and rim lath activity were investigated by one side. since the rim lath activity of a colony 4 and a colony 5 (both Gram's stain nature +) was very low among the above-mentioned colonies compared with colonies 1-3 (both Gram's stain nature -) · from future examination · removing · the culture medium by NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD., and ID test and EB-20 · using it · the gestalt of colonies 1-3 · biochemical · description was observed. The following result was obtained.

[0022] The bacteria which form a colony 1 (identification number: 900814-1)

(Domestic deposition was carried out as a Fermentation Research Institute mycoparasite No. 11664 from August 17, Heisei 2 in the Fermentation Research Institute, the Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industry, and the management was transferred to the international deposition which followed Budapest Treaty as FERM BP No. 3509 from August 12, Heisei 3) the gestalt indicated below · biochemical · description · being based · these bacteria · Serratia of Enterobacteriaceae · a group · then, it is presumed.

(a) Gestalt 1 Short rod 2 Maneuverability-less 3 Gram's-stain nature: - (b) Growth condition 1 standard agar medium: Form an opaque colony round in yellow · cream.

2) SS agar medium : form a white and translucent colony.

[· SS-agar-medium: · NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. code number: · 05031]

Under the presentation of 1l. Meat extract 5.0g Bile salt 9.0g A peptone 7.5g A lactose 10.0g Sodium citrate 8.5g Sodium thiosulfate 5.5g Ferric citrate 1.0g neutral red 0.025g PURIRANTO green 0.033g Agar 13.5g pH:7.1\*\*0.13 TSI agar medium: Although there is no change in a slant surface part, yellow a butt. Gas is generated.

[· TSI-agar-medium: · NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. code number: · 05103]

Under the presentation of 1l. Meat extract 5.0g NaCl 5.0g A peptone 15.0g A lactose 10.0g Sucrose 10.0g Grape sugar 1.0g Ferric citrate 0.2g Sodium thiosulfate 0.2g Phenol Red 0.02g Agar 15.0g pH: 7.6\*\*0.1 (c) Physiological property 1 VP reaction : + Generation of 2 Indore : · Generation of three hydrogen sulfide : · Use of 4 citric acids : + 5 ureases : + six oxidase : · 7 OF-test : · + (d) · availability 1 lactose [ of a carbon source ] : · + 2 adonitol : · 3 rhamnose : · + 4 mannite : · + 5 esculin : · + 6 inositol : · 7 sorbitol : · + 8 arabinose : · + 9 raffinose : · + 10 sucrose : · (e) · in addition to this · decarboxylation [ of one lysine ] : · use [ of 2 malonic acid ] : · decomposition [ of 3 arginine ] : · deamination reaction [ of 4 phenylalanine ] : · decarboxylation [ of 5 ornithine ] : · [0023] The bacteria which form a colony 2 (identification number: 900814-2)

(Domestic deposition was carried out as a Fermentation Research Institute mycoparasite No. 11665 from August 17, Heisei 2 in the Fermentation Research Institute, the Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industry, and the management was transferred to the international deposition which followed Budapest Treaty as FERM BP No. 3510 from August 12, Heisei 3) the gestalt indicated below · biochemical · description · being based · these bacteria · Enterobacter of Enterobacteriaceae · a group · then, it is presumed.

(a) gestalt 1 Short rod 2 maneuverability-less 3 Gram's-stain nature: - (b) growth condition 1 standard agar medium: · an opaque colony is formed in cream.

2) SS agar medium : form an opaque colony in red.

3) TSI agar medium : although there is no change in a slant surface part, yellow a butt. Gas is generated.

(c) Physiological property 1 VP reaction : + Generation of 2 Indore : · Generation of three hydrogen sulfide : · Use of 4 citric acids : + 5 ureases : + six oxidase : · 7 OF-test : · + (d) · availability 1 lactose [ of a carbon source ] : · + 2 adonitol : · 3 rhamnose : · + 4 mannite : · + 5 esculin : · + 6 inositol : · 7 sorbitol : · + 8 arabinose : · + 9 raffinose : · + 10 sucrose : · (e)

-- in addition to this -- decarboxylation [ of one lysine ] : -- use [ of -2 malonic acid ] : -- decomposition [ of +3 arginine ] : -- deamination reaction [ of +4 phenylalanine ] : -- decarboxylation [ of -5 ornithine ] : -- + [0024] The bacteria which form a colony 3 (identification number: 900814-3)

(Domestic deposition was carried out as a Fermentation Research Institute mycoparasite No. 11666 from August 17, Heisei 2 in the Fermentation Research Institute, the Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industry, and the management was transferred to the international deposition which followed Budapest Treaty as FERM BP No. 3511 from August 12, Heisei 3) the gestalt indicated below -- biochemical -- description -- being based -- these bacteria -- the punt air group of Enterobacteriaceae -- a group -- then, it is presumed.

(a) Gestalt 1 Short rod 2 Maneuverability-less 3 Gram's-stain nature: (b) Growth condition 1 standard agar medium: Form a round translucent colony in yellow.

2) SS agar medium : don't form a colony.

3) TSI agar medium : although there is no change in a slant surface part, yellow a butt. Gas is not generated.

(c) Physiological property 1 VP reaction : + Generation of 2 Indore : -- Generation of three hydrogen sulfide : -- Use of 4 citric acids : + 5 ureases : + six oxidase : -7 OF-test : -- (d) -- availability 1 lactose [ of a carbon source ] : -- +2 adonitol : -3 rhamnose : -- +4 mannite : -- +5 esculin : -- +6 inositol : -7 sorbitol : -8 arabinose : -- +9 raffinose : -10 sucrose : -- (e) -- in addition to this -- decarboxylation [ of one lysine ] : -- use [ of -2 malonic acid ] : -- decomposition [ of +3 arginine ] : -- deamination reaction [ of -4 phenylalanine ] : -- decarboxylation [ of -5 ornithine ] : -- [0025] 4) Colonies 1, 2, and 3 were moved to 1l. L-bouillon culture medium, respectively, overnight shake was carried out at 37 degrees C, at 5,000G and 4 degrees C, at long-intervals alignment processing was carried out for 20 minutes, and the harvest was carried out. This L-bouillon culture medium puts poly peptone 10g of Difco (Difco), 5g of yeast extracts of the company, and the best NaCl of Wako Pure Chem (5g) into distilled water, they double and carry out an autoclave to pH7.5 by NaOH, and, in addition, it dilutes and prepares 40% solution of the best glucose of Wako Pure Chem [ finishing / preparation / beforehand ] separately 400 times.

5) Each fungus body was suspended in 50ml distilled water, respectively, the heat phenol was added to this 90 50ml%, and it stirred for 20 minutes at 65-70 degrees C, and after cooling, at long-intervals alignment processing was carried out at 10,000G and 4 degrees C for 20 minutes, and water layers were collected. The phenol layer was given to the same actuation as the above twice [ further ]. Three water layers were doubled, overnight dialysis was carried out, the phenol was removed, and inner liquid was given to the ultrafiltration using UK-200 of Advantec Toyo Kaisha, Ltd. (ADVANTEC TOYO), and was condensed by molecular weight 200,000 cut-off (N2 \*\*: two atmospheric pressures).

6) About this concentration sample, it is Q-sepharose of a Pharmacia manufacture. The anion-exchange chromatography was given using the fast flow (Q-Sephadex Fast Flow). Namely, 10mM tris - 400mMNaCl / 10mM tris after giving a sample to a column with the buffer solution containing HCl (pH7.5) and NaCl of 10mM(s) - Elution of the rim lath activity fraction was carried out by HCl (pH7.5). On the same conditions as the above, this eluate was given to the ultrafiltration, was desalted and condensed, and LPS of 96% or more of purity was obtained. In addition, a nucleic acid is 1MNaCl / 10mM tris. - It was eluted in HCl (pH7.5).

[0026] The result of each fungus body was as in next Table 2 - 4. The amount of nucleic acids calculated purity (%) based on the degree type based on the measured value in OD (260nm) (10D=50microg).

[0027]

[Equation 2]

$$\text{純度} = \frac{\text{乾燥収量} - (\text{蛋白量} + \text{核酸量})}{\text{乾燥収量}} \times 100$$

[0028]

[Table 2]

菌体900814-1

総乾燥収量 (mg) 6.8  
LPS (mg) 19.8  
糖 (mg) 3.1  
蛋白 ( $\mu$ g) 86  
核酸 ( $\mu$ g) <161  
純度 (%) 96<

[0029]

[Table 3]

菌体900814-2

総乾燥収量 (mg) 10.4  
LPS (mg) 75.6  
糖 (mg) 2.5  
蛋白 ( $\mu$ g) 64  
核酸 ( $\mu$ g) <108  
純度 (%) 98<

[0030]

[Table 4]

菌体900814-3

総乾燥収量 (mg) 19.2  
LPS (mg) 103.6  
糖 (mg) 7.6  
蛋白 ( $\mu$ g) 73  
核酸 ( $\mu$ g) <137  
純度 (%) 99<

[0031] 7) When measuring the molecular weight of molecular weight each fungus body LPS by SDS-2 law like the example 1 of manufacture, it was 5,000\*\*1,000 (LPS1 originating in a fungus body 900814-1), and 6,500\*\*2,500 (this-it is LPS2 and this-originating in 2 LPS3 originating in 3). Those dyeing bands in the argentation are shown in drawing 4. By drawing 4, numbers 1-3 correspond to LPS1-LPS3, respectively. As shown in drawing 4, LPS1 showed mist and the collected dyeing band to the molecular weight 30,000 neighborhood. LPS2 is presumed that there are very few things of a macromolecule as compared with whenever [14,000 or less dyeing / of a dyeing band], although a dyeing band is accepted also between 30,000 and 43,000. Even if it judges from the sugar volume and the amount of hexosamines which are mentioned later, LPS2 has the lowest sugar content, subsequently it becomes high in order of LPS3 and LPS1, and it is thought that it is in agreement with the pattern observed by electrophoresis. Moreover, the ratio of the amount of LPS / the total desiccation yield is also low in order of LPS2, LPS3, and LPS1. It

is presumed that LPS2 has much comparatively low-molecular LPS, and its rate of the decreases subsequently to the order of LPS3 and LPS1 from the above observation result.

[0032] 8) Lynn content chain-TORIBARA (Chen-Toribara) -- law [-- work, such as a chain, "analytical chemistry (Analytical Chemistry), vol.28, and 1756-1758 pages (1956) -- being based -- a degree -- it went to pass. LPS1, LPS2, and LPS3 were dissolved in distilled water at each \*\*, the solution of 20microl containing LPS of 31.6microg, 57.6microg, and 103.6microg was prepared, respectively, and it put into the small test tube. The 50 v/v% sulfuric acid of 20microl was added, and it heated at 160 degrees C for 2 hours. Subsequently, after adding the 10 v/v% perchloric acid of 20microl, it heated for 1 minute and was made to ash with a gas burner. After that, 0.5ml distilled water and after adding the 0.5ml reaction reagent (1ml 6-N sulfuric acid, 2ml distilled water, a 2ml 2.5 v/w% ammonium molybdate, and 1ml 10 v/w% of ascorbic acid are mixed and prepared, and the 0.5ml is used) subsequently and leaving it for 30 minutes at a room temperature, the absorbance OD in 820nm (820nm) was measured. In addition, as a sample for calibration-curve creation, the potassium dihydrogenphosphate (Wako Pure Chem make) was diluted with distilled water, and the 0.5ml solution which contains 2.5microg, 1microg, 0.25microg, and 0microg as phosphoric-acid weight, respectively was prepared and used. In addition, it is equivalent to 4.39g of potassium dihydrogenphosphates Lynn 1g. A result is shown in Table 5. In addition, the numeric value which shows an absorbance is a value which reduced the data of the contrast which has not heat-treated, in order to avoid the error by mixing (for example, it originates in a phosphate buffer solution) of inorganic phosphorus. The amount of Lynn (mug) is the value calculated from the amount of extinction. The amount of Lynn (% of the weight) was calculated by the degree type. In addition, "0.67" in a formula points out standard OD value of Lynn 1microg, and sample concentration points out the concentration (mg/ml) of each LPS dissolved in distilled water.

[0033]

[Equation 3]

$$\text{リン量 (重量\%)} = \frac{\text{サンプル吸光度}}{0.67 \times (\text{サンプル濃度}) \times 0.05}$$

[0034] The number of Lynn is the number of conversions per molecular weight 5,000 calculated by the degree type.

[0035]

[Equation 4]

$$\text{リン数} = \text{リン量 (重量\%)} \times \frac{5,000}{31}$$

[0036]

[Table 5]

L P S	吸光度	リン量 (μg / μg)	リン量 (重量%)	リン数
1	0.36	0.54 ( / 32 )	1.7	2 ± 1
2	0.31	0.46 ( / 58 )	0.8	1 ~ 2
3	0.87	1.30 ( / 104 )	1.3	2 ± 1

[0037] 9) hexosamine content Elson-Morgan (Elson-Morgan) -- law (377-379 pages of Tokyo Kagaku Dojin publication "biochemistry experiment lecture" No.4) -- being based -- a degree -- it went to pass. LPS was dissolved in distilled water, the solution of 5.18mg [ 1.58mg (LPS1) 2.88mg (LPS2), and ] (LPS3)/ml was prepared, the 100microl was put into the spitz with a screw cap (Iwaki glass company make), 8NHCl(s) of 100microl were added to this, and it heated at 110 degrees C for 16 hours. About 200microl addition of 4NNaOH(s) was done, and it was referred to as pH7. After having isolated the 100microl preparatively, putting into another spitz with a screw cap and adding the following

reagent A of 200microl, it heated at 105 degrees C for 1.5 hours, and, subsequently cooled with the stream. Subsequently, 100microl was isolated preparatively, 96% ethanol of 670microl was added, and further, after adding the following reagent B of 67microl, it was left at the room temperature for 1 hour, and the absorbance was measured by 535nm. As a sample for calibration-curve production, it is 0.20-200microg [ml] N-acetyl. The glucosamine (Wako Pure Chem make) was used.

(A) Reagent) The acetylacetone of 75microl and 2.5ml 1.25-N sodium carbonate were mixed and prepared.

(B) Reagent) 30ml 96% ethanol was mixed with 1.6g p-dimethyl benzaldehyde and 30ml concentrated hydrochloric acid, and it prepared.

The result and the number of hexosamines of LPS1, LPS2, and LPS3 were the 9\*\*1-/molecular weight 5,000, the 7\*\*1-/molecular weight 5,000, and the 5\*\*1-/molecular weight 5,000 respectively.

[0038] 10) a KDO content KDO (2-keto-3-deoxy oct NETO) content -- the diphenylamine method [work, analytical BAIOKEMU (Analytical Biochem.), 58 (1), and 123-129 pages (1974), such as a SHABI R (Shaby R.),] -- being based -- a degree -- it went to pass. A 500mg diphenylamine, 5ml ethanol, a 45ml glacial acetic acid, and 50ml concentrated hydrochloric acid (all Wako Pure Chem make) were doubled, and the KDO detection reagent was prepared. Either of 250microl distilled water solution; containing 250microl distilled water solution;(3)0.518mg/ml LPS3 containing 250microl distilled water solution;(2)0.576mg/ml LPS2 which contains (1)0.505mg/ml LPS1 in the 500microl is doubled. It was [ 100-degree C ebullition ] under water bath, and cooled for 30 minutes in cold water (24.5 degrees C) after heating for 33 minutes, and, subsequently 420, 470, and the ultraviolet-region absorption by 630 or 650nm were measured using the Hitachi spectrophotometer 320 (measured value is respectively set to A420, A470, A630, and A650). As a standard sample, 250micro of distilled water l containing 0.5micro mol [ml] KDO ammonium salt [the U.S. sigma (Sigma) company make] was used. The value of a degree type was calculated about a specimen sample and each standard sample.

The value (ST) of a S=A420-A470+A630-A650 specimen sample was [ in LPS1 ] 0.099 in 0.078 and LPS3 at 0.109 and LPS2. The value (SS) of a standard sample was 0.246 and the value of only distilled water was 0.005. It was presumed by the comparison of this value per molecular weight 5,000 and at LPS1 at LPS2 of 2\*\*1 that 2\*\*1 KDO was contained in 1:2 LPS3. In addition, these values will be calculated as follows, if LPS1 is taken for an example. It is [0039] when concentration of KDD contained in a solution is set to chi (micromol/ml).

[Equation 5]

$$\frac{0.5}{0.246} = \frac{x}{0.109}$$

[0040] It is set to chi=0.221 from the above-mentioned formula. Therefore, if the number of mols of KDD contained in one mol (5,000 and assumption) of LPS1 is set to y, it will be set to y= 2.19 by the degree type.

[0041]

[Equation 6]

$$y = x \times 10^{-6} \times \frac{5,000}{0.505 \times 10^{-9}} = 2.19$$

[0042] The following is the example of a formula of the pharmaceutical preparation containing LPS of this invention. In addition, the amount of LPS in examples 1-4 is the amount of Escherichia coli LPS conversions by the rim lath test. Example 1 (tablet)

Wheat LPS 0.04g6% HPC lactose 178g stearin acid talc 8g potatostarch 14g or more was mixed and tableted and 400 0.5g tablets containing the 0.1mg wheat LPS were prepared.

Example 2 (mixtures for internal use)

**実施例 3 (軟育剤)**

LPS 1	0. 1 g
精製ラノリン	8 0 g
黄色ワセリン	適量
	1 0 0 0 g

**実施例 4 (注射剤)**

LPS 3	0. 5 mg
注射用蒸留水	適量
合計	1 0 0 0 m l

Chlorella LPS 1mg purified water 100ml

[0043] The example 1 (quantum of the rim lath test sun plant LPS) of an experiment the quantum of the rim lath test positivity LPS contained in various vegetation -- the ibis of Seikagaku, Inc. -- it carried out using the SHIKARA-system.

\*\* Distilled water for injection was 180micro[ per hole ] l Put into the flat bottom or circular plate of 96 holes. 20micro (when a sample was a solid-state, it dissolved in distilled water for injection, and prepared) of samples l was added to one of the holes of a plate. Stirring by the plate mixer, pipetting was performed and the diluent was prepared 10 times. henceforth, a sequential dilution sample is taken 20microl every, and dilution sequence liquid can be prepared 10 times with 100 times, 1000 times, and -- by processing similarly. Moreover, a dilution ratio can be set as arbitration by changing the quantitative ratio of distilled water for injection and a sample.

\*\* The 100,000 time diluent of a 1.5microg [ml] Escherichia coli LPS solution was prepared as an internal standard, and it checked that dilution and rim lath test coloring were normal.

\*\* 35micro of 10 time diluents l of the above-mentioned \*\* -- for the hole of another plate -- the ibis of Seikagaku, Inc. -- LS-one set 35microl of a SHIKARA-system was added, and it was left for 30 minutes at 37 degrees C. Subsequently, 1M acetic-acid water of 105microl was added and stirred, and the reaction was stopped. an absorbance with a wavelength [ of this sample solution ] of 415nm -- the object for 96 holes -- it measured by absorbance meter plate reader MTP-100 (Corona Electric Co., Ltd. make). as a background -- distilled water -- as the object for calibration-curve creation -- the ibis of 42 pg(s)/ml Seikagaku, Inc. -- the calibration curve was created using the ET-1 set of a deer large stem, and the quantum of the rim lath test positivity LPS in each sample was performed on the basis of this calibration curve. (The absorbance in case a sample is distilled water was set to 0.) When said LS-1 set was used by this approach and it did not go into this range in addition since it was checked that quantum nature is in coloring within the limits of ten to 45 pg/ml, it changed and re-experimented in the dilution ratio. The quantum value of a dilution sample is x (value read in the calibration curve) (dilution ratio).

It came out and calculated. In the case of a solid sample, in the case of a liquid sample, the obtained result is shown in next Table 6 · 11 in a ng/ml unit per ng/g. In addition, the firm name of the column of the sample of front Naka, the name of a place, etc. put the acquisition place of the sample concerned, and a place of production. The elegance without this publication is the elegance purchased in Tsukui, Kanagawa County Nakano-cho store of superstore Chujitsuya, and points out what has an unknown manufacturer. In addition, "Hok Wren" is the abbreviated name of the Hokkaido Agricultural Cooperative Association union meeting.

[0044]

[Table 6]

リムラステスト陽性

試料 (固体)

L P S 量 (n g)

裸子植物

松の実 (興南貿易) 1 2 5

単子葉類

硬質系小麦種子 (千葉製粉) 2, 2 5 0

硬質系小麦種子 (千葉製粉)

(分子量 5 0 0 0 以上) 1, 0 0 0, 0 0 0

硬質系小麦粉 (千葉製粉) 7, 5 0 0

小麦ふすま (千葉製粉)

(分子量 5 0 0 0 以上) 3 0 0

小麦胚芽 (千葉製粉) 1, 6 0 0

小麦胚芽 (千葉製粉)

(分子量 5 0 0 0 以上) < 1 0, 0 0 0

玄米 1, 1 0 0

米粉 (日の本穀粉)

(分子量 5 0 0 0 以上) 3 1, 0 0 0, 0 0 0

米ぬか 2 9, 0 0 0

米ぬか (分子量 5 0 0 0 以上) 5 0 0, 0 0 0

コーンフラワー (大洋飼料)

(分子量 5 0 0 0 以上) < 0. 3

コーングリッツ (大洋飼料)

(分子量 5 0 0 0 以上) 1 2 0

コーン (和光食糧) 2 0 0

クマ笹 (関本物産) 1 5, 0 0 0

アヤメ (種子) 3, 3 0 0

[Table 7]

ニンニク（鱗茎）	70
アスパラガス（芽）	4,500
ミョウガ（花房）	41,000
ヨクイニン（ウチダ和漢薬）	2,300
（原植物は精麦）	
ハンゲ（松浦薬業）	5,500
（原植物はカラスビシャク）	
バクモントウ（新木天海堂）	4,000
（原植物はジャノヒゲ）	
ターメリック（エスビー食品）	195,000
（原植物はウコン）	

#### 双子葉類

大豆（三女食品）	150
大豆（ホクレン）（分子量5000以上）	400
丹波黒大豆（和光食糧）	85
小豆（和光食糧）	450
小豆（和光食糧）	
（分子量5000以上）	36,000,000
ひたし豆（和光食糧）	800
大正金時（和光食糧）	550
大福豆（和光食糧）	350
ジャガイモ（ホクレン）	
（分子量5000以上）	<0.3
ビワ（種子）	800
アボガド（種子）	950
モモ（種子）	4,500

[Table 8]



クルミ（種子）	1,900
ソラ豆（種子）	750
カボチャ（種子）	10,000
トマト（生の実）	10,500
カイワレダイコン（根を除く）	50,000
マタタビ（丸久物産）	40,000
アマチャズル（K.K.桜井）	73,000
ドクダミ（湿潤重量当たり）	
（帝京大学薬用植物園）	1,200
胡椒（白）（エスビー食品）	2,300
トウガラシ（興南貿易）	2,300
八角（興南貿易）	5,500
ナツメグ（ライオン）	2,000
（原植物はニクズク）	
トウヒ（ウチダ和漢薬）	8,000
（原植物はダイダイ）	
カッコン（栃木天海堂）	3,000
（原植物はクス）	
ナンキンカンゾウ（ウチダ和漢薬）	18,000
オタネニンジン（ウチダ和漢薬）	45,000
ボウフウ（栃木天海堂）	50,000
カンボウイ（栃木天海堂）	600,000
（原植物はオオツツラフジ）	
チョウトウコウ（ウチダ和漢薬）	7,000
（原植物はウンカリヤ・ヒルスタ）	
八味地黄丸（カネボウ薬品）	17,000

[Table 9]

小柴胡湯（ツムラ）	13,000
五苓湯（ツムラ）	12,000
猪苓湯（ツムラ）	14,000
十全大補湯（ツムラ）	8,000
八味地黄丸（ツムラ）	8,000
ローヤルゼリー	1,000
〔ベキン ローヤルゼリー（Pekin Royal Jelly）〕	
ハチミツ（加藤美峰園本舗）	800

#### シダ植物

スギナ（湿潤重量当たり）	700
（帝京大学薬用植物園）	
ゼンマイ（関本物産）	10,000

#### ソウ類

わかめ（三陸天然品）	11,000
わかめ芽株（森谷健康食品）	200,000
ひじき（生）	85,000
芽ひじき（小善本店）	105,000
コブ（ヤマトタカハシ）	235,000
アサクサノリ（乾燥生ノリ）	130,000
クロレラ（株式会社ヘルスタージャパンYS）	1,900,000
クロレラ（株式会社マンナンフーズYS）	1,000,000

#### 菌類

椎茸（下仁田産）	16,000
えのき茸（長野県中野市）	20,000
しめじ（勢多郡宮城町）	40,000
まいたけ（大利根）	205,000

[Table 10]

あわび茸（羽生）	8,000
マッシュルーム	20,000
きくらげ	75,000
ナメコ	21,000
エビオス（アサヒビール社製 ビール酵母）	250,000
冬虫夏草	240,000

#### その他

雪印ナチュレヨーグルト（株式会社雪印）	5,000
グリコビフィズスヨーグルト（株式会社グリコ）	50

#### リムラステスト陽性

<u>試料（液体）</u>	<u>L P S 量（n g）</u>
<u>ビール</u>	
キリン ファインビルスナー	1,150
ラガービール	1,250
ハートランド	1,550
ファインドラフト	1,400
アサヒ スーパースーパースト	600

#### ワイン

サントリー サントネージュ（白）	13
（赤）	24
シードル（アップル）	900

#### 日本酒

大関一級（大関酒造）	2.4
黄桜二級（黄桜酒造）	1.7

[Table 11]

大寒吟醸二級（玉泉堂酒造）	2. 1
<u>玄米酒</u>	
日ター献（大関酒造）	1 2
<u>薬味酒</u>	
陶陶酒デルカップ（陶陶酒本舗）	1. 2
<u>焼酎</u>	
宝焼酎（宝酒造）	< 2. 0
<u>その他</u>	
キョーレオビン（湧永製薬）	6 0 0
ニンニク抽出液（湧永製薬）	3 5 0
グロスキュー（クロレラ工業）	6, 0 0 0
大麦健康メッコール（韓国・一和）	2, 0 0 0
サクロンハーブ液（エーザイ）	1, 0 0 0
ヘチマ水（自家製）	7 0 0
バイオアルゲン（クロレラ工業）	4 0 0
パンシロン内服液（ロート製薬）	2 0 0
ユンケルファンティー（佐藤製薬）	5 0
コリホグス（小林製薬）	3 0
ツディ（三共）	2 0
ミオDコーワ100（コーワ）	1 0
リゲイン（三共）	9
ロブレン50（第一製薬）	7
ソルマック（大腸製薬）	6
ローゼリーゴールド（中外製薬）	5
バスビタン30（常盤製薬）	5
チオビタ（大腸製薬）	5 未満
リボビタン（大正製薬）	5 未満
アスパラゴールド（田辺製薬）	5 未満

[0045] The example 2 (the selection approach of LPS that the contents of the rim lath test positivity LPS which give ED50 at the time of activating the in vitro TNF production ability of a macrophage are 0.4 · 100ng / culture medium ml) of an experiment

200micro [ of macrophage abdominal cavity resident cells ] 1 (2x10<sup>5</sup> pieces) / hole of the C3 H/helium mouse of the male of each three groups with an average weight [ 29g ] of 9 weeks old are put into the flat bottom plate of 96 holes, and it is addressing \*\*\*\*\* to 10microl to each hole about recombination mouse 1 FN-gamma (100 units / ml) as a primer. Various dilution of the extract which extracted the various sources of LPS for 5 hours, and prepared them

with 65-degree C hot water (g/ml) was carried out separately, and its 10microl / hole was added as a trigger 3 hours after primer administration. Centrifugal separation actuation was given after 2-hour culture (3000 G or 20 minutes). toxicity [ as opposed to L929 cell in the TNF activity of 130microl obtained from each hole ] -- being based -- measuring -- moreover, a rim lath test positivity LPS content -- the ibis of Seikagaku, Inc. -- it measured using the deer large stem. The sigmoid curve which plots measured value on the coordinate which expresses the amount of TNF production (a unit / culture medium ml) to an axis of ordinate, and expresses a correspondence rim lath test positivity LPS content (ng / culture medium ml) with an axis of abscissa (logarithmic scale), and is presumed from plotted each point was drawn. Macrophage activation ability of each trigger which gives the amount of TNF production at the time of not prescribing a trigger for the patient was made into 0%, macrophage activation ability of each trigger when the amount of TNF production which increases as effectiveness of trigger administration reaches the maximum constant weight was made into 100%, and the rim lath test positivity LPS content which gives the macrophage activation ability which corresponds to the 50% was read in the curve. The result of the source of LPS extraction where the correlation of macrophage activation ability and a rim lath test positivity LPS content fulfilled the above-mentioned conditions is shown in Table 12 · 14. It is front Naka, and in "TNF", "activation ability" expresses macrophage activation ability (%), and "LPS" expresses a rim lath test positivity LPS content (ng / culture medium ml) for the amount of TNF production (a unit / culture medium ml). In addition, since the amounts of TNF production at the time of trigger additive-free were 0.75 units / ml, the case where the amounts of TNF production were below 0.75 units / ml was made into 0% of macrophage activation ability, and macrophage activation ability (%) was calculated by the degree type.

[0046]

[Equation 7]

$$\frac{\text{TNF 産生量} - 0.75}{\text{TNF 産生最大恒量} - 0.75} \times 100$$

[0047]

[Table 12]

L P S 源	T N F	活性化能	L P S
ターメリック	0.75	0	0
	3.9	9	0.6
	36.3	100	60
	36.3	100	> 1000
カンボイ	0.75	0	0
	40.7	100	4
	36.5	90	400
	40.7	100	> 1000
コンブ	0.75	0	0
	1.3	4	0.8
	13.0	100	80
	13.0	100	> 1000
アサクサノリ	0.75	0	0
	1.0	2	0.3
	12.8	100	30
	12.8	100	> 1000
ワカメ芽株エキス	0.75	0	0
	1.3	4	0.2
	15.5	100	20
	15.5	100	> 1000
芽ヒジキ	0.75	0	0
	5.7	8	0.7
	62.7	100	70
	62.7	100	> 1000

[Table 13]

エビオス	0.75	0	0
	0.6	0	0.7
	30.6	100	70
	30.6	100	> 1000
冬虫夏草	0.75	0	0
	2.0	4	0.4
	30.3	100	40
	30.3	100	> 1000
ワカメ芽株	0.75	0	0
	0.9	1	0.4
	22.7	100	40
	22.7	100	> 1000
クロレラ	0.75	0	0
	39.2	100	9.6
	35.0	89	960
大腸菌 L P S	0.75	0	0
	3.6	27	2
	10.2	89	20
	11.4	100	200
	10.9	95	2000
小麦 L P S	0.75	0	0
	0.7	0	2
	10.1	99	21
	10.2	100	210
	8.5	82	2100

[Table 14]

百日咳菌 L P S	0.75	0	0
	0.7	0	11
	3.3	55	110
	5.4	100	1100
リビド A	0.75	0	0
	4.7	37	2
	9.4	80	24
	11.1	96	240
	11.5	100	2400

[0048] The example 3 (growth facilitatory effect in a laboratory animal - the 1) of an experiment

The C3 H/helium male mouse was made to carry out free intake of after birth, distilled water (six animals), and distilled water prepared so that powder A-a (5 ng(s)/ml (six animals) and 50 ng/ml (five animals))2 (example 1 of manufacture) might be included by LPS conversion, respectively. (The distilled water intake group, 5ng intake group, and 50ng intake group are called hereafter, respectively) others -- feed conditions are completely the same and carried out free intake of feed CE-2 the rat of the Japan, Inc. Clare marketing, and for mice. Weight was measured after birth and the result shown in the next table 15 was obtained as the average (animal) of each group. The rate of increase in the column of front Naka, 5ng intake group, and 50ng intake group expresses the rate of increase (%) to the average of the distilled water administration group of those averages, respectively.

[0049]

[Table 15]

日齡	蒸留水投与群 の体重 (g)	5 n g 投与群		5 0 n g 投与群	
		体重 (g)	増加率 (%)	体重 (g)	増加率 (%)
2 0	1 1 . 4	1 1 . 4	0 . 0	1 3 . 4	1 7 . 5
2 5	1 6 . 4	1 6 . 1	- 1 . 8	1 8 . 0	9 . 8
2 9	1 9 . 9	1 9 . 7	- 1 . 0	2 1 . 1	6 . 0
3 3	2 1 . 6	2 1 . 3	- 1 . 4	2 2 . 7	5 . 1
3 7	2 1 . 9	2 2 . 0	0 . 5	2 2 . 9	4 . 6
4 1	2 1 . 8	2 2 . 2	1 . 8	2 3 . 2	6 . 4
4 5	2 3 . 3	2 4 . 1	3 . 4	2 5 . 1	7 . 7
4 9	2 3 . 4	2 4 . 6	5 . 1	2 5 . 5	9 . 0
5 3	2 4 . 2	2 5 . 2	4 . 1	2 6 . 5	9 . 5

[0050] Drawing 5 graph-izes the result shown in Table 15. It is clearer than Table 15 and drawing 5 that a growth facilitatory effect with significant LPS of this invention is shown.



[0051] The example 4 (growth facilitatory effect in a laboratory animal · the 2) of an experiment Free intake of distilled water prepared so that powder A-a (5 ng(s)/ml and 50 ng/ml)2 (example 1 of manufacture) might be included in the C3 H/helium female mouse which is \*\*\*\*(ing) by distilled water and LPS conversion, respectively was carried out. (The distilled water intake group, 5ng intake group, and 50ng intake group are called hereafter, respectively.) Four female mice born from seven animals and 50ng intake group in the female mouse born from five animals and 5ng intake group in the female mouse born from the distilled water intake group mouse after intake initiation on the 6th were chosen, and the respectively same object as a parent mouse was made to take in from the 20th after birth. Other feed conditions are completely the same from before birth, and carried out free intake of feed CE-2 the rat of the Japan, Inc. Clare marketing, and for mice. The weight of each mouse was measured from the 20th after birth, and the result shown in the next table 16 was obtained as the average (animal) of each group. The rate of increase in the column of front Naka, 5ng intake group, and 50ng intake group expresses the rate of increase (%) to the average of the distilled water administration group of those averages, respectively.

[0052]

[Table 16]

日 齢	蒸留水投与群 の体重 (g)	5 n g 投与群		5 0 n g 投与群	
		体重 (g)	増加率 (%)	体重 (g)	増加率 (%)
2 0	1 0 . 4	1 0 . 4	0 . 0	1 2 . 9	2 4 . 0
2 5	1 3 . 0	1 3 . 6	4 . 6	1 5 . 9	2 2 . 3
2 9	1 4 . 8	1 6 . 0	8 . 1	1 7 . 3	1 6 . 9
3 3	1 6 . 2	1 7 . 4	7 . 4	1 9 . 1	1 7 . 9
3 7	1 6 . 7	1 7 . 9	7 . 2	1 9 . 9	1 9 . 2
4 1	1 7 . 1	1 8 . 1	5 . 8	1 9 . 7	1 5 . 2
4 5	1 8 . 5	1 9 . 0	2 . 7	2 0 . 8	1 2 . 4
4 9	1 7 . 8	1 9 . 3	8 . 4	2 1 . 1	1 8 . 5
5 3	1 8 . 7	1 9 . 6	4 . 8	2 1 . 8	1 6 . 6

[0053] Drawing 6 graphizes the result shown in Table 16. The comparison with the result shown in that a growth facilitatory effect with LPS of this invention more significant than Table 16 and drawing 6 is shown, Table 15, and drawing 5 shows the growth facilitatory effect doubles [ about ] by making the parents in \*\*\*\* take in rather than making LPS of this invention take in for the first time after birth.

[0054] Naturally, under severe management of the medical practitioner in charge or the veterinarian, although the amount at the time of prescribing LPS of a dose, administration spacing, and toxic value this invention for the patient as a growth accelerator and a growth accelerator for animals and administration spacing take into consideration the age for administration, a symptom, weight, and the administration effectiveness and are determined according to an individual By adult (60kg) of human being, by internal use, it is set to 10ng-10mg by 1micro g-100mg and vein administration, and 100ng-1mg sets it the temporary standard of 1 time per of a dose day at dermal administration. In addition, for an animal, large-sized animals, such as a cow and a horse, make 1/60 of the above-mentioned amount the standard of the amount per weight of 1kg, the amount of 2 double can be made into the standard of the amount per weight of 1kg, and in the medium size of a pig, a dog, a cat, etc., and a small animal, further, make the amount of 2 double the standard of the amount per weight of 1kg, and can prescribe it for the patient by birds such as a hen,. In addition, BERENSU KERUBA (Behrens K [External Character 1])

rbcr -- fifty percent lethal dose of LPS1, LPS2, and LPS3 in a C3 H/helium male mouse with an average weight [ 22g ] of 7 weeks old calculated by law -- respectively -- 150 and 180 or 180microg/animal -- it is -- Escherichia coli LPS-- it was 60% or less with a value [ of 0128by U.S. Difco (Difco):B8] ] of 300microg [/animal ]. Moreover, toxic value fifty percent lethal doses (average in the male BALB/C mouse of one groups [ two ] and the average weight of 45g) of Wheat LPS (example 1 of manufacture), Escherichia coli LPS (same as the above), and Bordetella pertussis LPS (example 3 of manufacture) were 3.2, 3.4, and 11 mg/kg in intravenous administration, respectively, and were 16, 16, and 32 mg/kg in intracutaneous administration, respectively.

[0055]  
[Effect of the Invention] By this invention, it has the outstanding growth facilitatory effect, a premature baby's birth is prevented, there is neither a side effect nor a problem of a residual property in the living body, long-term use is possible, a production cost is low, moreover, it is in taking orally, transderma, dipping, and any path of injection, and the growth accelerator and the growth accelerator for animals which can be supplied to the mass which can be prescribed for the patient are offered.

---

## DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the chart illustrating the peak which shows existence of the fatty acid in a molecule obtained covering Wheat LPS over a gas chromatography.

[Drawing 2] It is the chart illustrating the peak which shows existence of the fatty acid in a molecule obtained covering Escherichia coli LPS over a gas chromatography.

[Drawing 3] It is the chart illustrating the peak which shows existence of the fatty acid in a molecule obtained applying Bordetella pertussis LPS to a gas chromatography.

[Drawing 4] It is drawing showing the pattern in SDS-2 law of LPS1, LPS2, and LPS3.

[Drawing 5] It is the graph which shows the growth facilitatory effect of LPS of this invention.

[Drawing 6] It is the graph which shows the growth facilitatory effect of LPS of this invention.

[Description of Notations]

In 2 of LPS1, in drawing 4 , 3 of LPS2 shows [ 1 ] the pattern of LPS3.

In \*\* of a \*\*\*\*\* administration group, in drawing 5 and drawing 6 , \*\* of 5ng administration group of LPS of this invention shows the data of 50ng administration group of LPS of this invention.

---

[Translation done.]

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/78		C 7180-4C		
35/66		9165-4C		
35/80	A	7180-4C		
37/20	A E R	8314-4C		
	A G Z	8314-4C		

審査請求 未請求 請求項の数11(全 31 頁)

(21)出願番号	特願平3-357351	(71)出願人	000199441 千葉製粉株式会社 千葉県千葉市美浜区新港17番地
(22)出願日	平成3年(1991)12月2日	(71)出願人	000193553 水野 伝一 神奈川県鎌倉市岡本18
		(71)出願人	390025210 柚 源一郎 東京都世田谷区東玉川1-10-21
		(72)発明者	柚 源一郎 東京都世田谷区東玉川1-10-21
		(72)発明者	吉村 淳 千葉県千葉市磯辺3-26-7

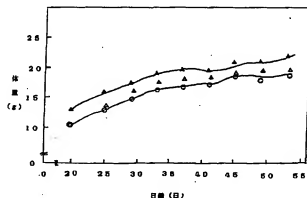
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 LPSを含む発育促進剤及び動物用発育促進剤

(57)【要約】

【目的】 発育促進効果が高く、長期使用が可能であり、経口、経皮、薬浴、注射のいずれでも投与可能な発育促進剤、動物用発育促進剤を提供する。

【構成】 下記LPSの少なくとも1種を含むことを特徴とする。LPSのインビトロで培養されるマクロファージのTNF産生能を活性化させるLPSのマクロファージ活性化能を指標とし、縦軸に、そのLPSを添加しないときのマクロファージのTNF産生量を与えるマクロファージ活性化能を0%、マクロファージのTNF産生量を最大恒量にする時のLPSのマクロファージ活性化能を100%とするマクロファージ活性化能(%)を表し、横軸に、そのLPSのリムラテスト陽性LPS含有量を対数尺で表すシグモイド曲線を描くとき、マクロファージ活性化能のED<sub>50</sub>を与えるリムラテスト陽性LPS含有量が0.4~100ng/培養液mlであるLPS。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 LPSを含む発育促進剤であり、インビトロで培養されるマクロファージのTNF産生能を活性化するLPSのマクロファージ活性化能を指標とし、

縦軸に、そのLPSを添加しないときのマクロファージのTNF産生量を与えるマクロファージ活性化能を0%、マクロファージのTNF産生量を最大恒量にする時のLPSのマクロファージ活性化能を100%とするマクロファージ活性化能(%)を表し、横軸に、そのLPSのリムラステスト陽性LPS含有量を対数尺で表すシグモイド曲線を描くとき、

マクロファージ活性化能のED<sub>50</sub>。を与えるリムラステスト陽性LPS含有量0.4~100ng/培養液mlであるLPSの少なくとも1種を含む発育促進剤。

【請求項2】 LPSが、植物から得られるLPS、細菌から得られるLPS、リピドA、それらの合成LPS及びそれらの混合物からなる群から選択される、請求項1記載の発育促進剤。

【請求項3】 植物から得られるLPSが、小麦から得られ、次の物性を有するLPSである、請求項2記載の発育促進剤。

主要分子量：8,000±1,000 (SDS-1法による)

8,000±1,000 (SDS-2法による)

5,000±2,000 (SDS-2法による)

リン数：1~4/分子量8千

ヘキソサミン数：6±2/分子量8千

脂肪酸数：6±2/分子量8千

KDO数：5±1/分子量8千

【請求項4】 植物から得られるLPSが、クロレラから得られ、次の物性を有するLPSである、請求項2記載の発育促進剤。

主要分子量：40,000~90,000 (SDS-2法による)

リン数：4±1/分子量1万

ヘキソサミン数：7±1/分子量1万

脂肪酸数：6±1/分子量1万

KDO数：2±1/分子量1万

【請求項5】 細菌から得られるLPSが、大腸菌から得られ、次の物性を有するLPSである、請求項2記載の発育促進剤。

主要分子量：40,000±10,000 (SDS-2法による)

8,000±4,000 (SDS-2法による)

リン数：12/分子量3万

ヘキソサミン数：45±6/分子量3万

脂肪酸数：18/分子量3万

KDO数：5±1/分子量3万

【請求項6】 細菌から得られるLPSが、次の物性を

有するLPSである、請求項2記載の発育促進剤。

主要分子量：5,000±1,000 (SDS-2法による)

リン数：2±1/分子量5,000

ヘキソサミン数：9±1/分子量5,000

KDO数：2±1/分子量5,000

【請求項7】 細菌から得られるLPSが、次の物性を有するLPSである、請求項2記載の発育促進剤。

主要分子量：6,500±2,500 (SDS-2法による)

リン数：1~2/分子量5,000

ヘキソサミン数：7±1/分子量5,000

KDO数：1~2/分子量5,000

【請求項8】 細菌から得られるLPSが、次の物性を有するLPSである、請求項2記載の発育促進剤。

主要分子量：6,500±2,500 (SDS-2法による)

リン数：2±1/分子量5,000

ヘキソサミン数：5±1/分子量5,000

KDO数：2±1/分子量5,000

【請求項9】 細菌から得られるLPSが、百日咳菌から得られ、次の物性を有するLPSである、請求項2記載の発育促進剤。

主要分子量：6,000±1,000 (SDS-2法による)

リン数：4/分子量6千

ヘキソサミン数：12/分子量6千

脂肪酸数：4/分子量6千

KDO数：2±1/分子量6千

【請求項10】 細菌から得られるLPSが、A、ラヂオバクターLPSである、請求項2記載の発育促進剤。

【請求項11】 LPSを含む動物用発育促進剤であり、インビトロで培養されるマクロファージのTNF産生能を活性化するLPSのマクロファージ活性化能を指標とし、縦軸に、そのLPSを添加しないときのマクロファージのTNF産生量を与えるマクロファージ活性化能を0%、マクロファージのTNF産生量を最大恒量にする時のLPSのマクロファージ活性化能を100%とするマクロファージ活性化能(%)を表し、横軸に、そのLPSのリムラステスト陽性LPS含有量を対数尺で表すシグモイド曲線を描くとき、マクロファージ活性化能のED<sub>50</sub>。を与えるリムラステスト陽性LPS含有量0.4~100ng/培養液mlであるLPSの少なくとも1種を含む動物用発育促進剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、発育促進剤及び動物用発育促進剤に関する。より詳細には、本発明は、LPSを含む発育促進剤及び動物用発育促進剤に関する。

【0002】

【従来の技術】人間の場合、出生時の体重が2,500g未満のものを未熟児と呼び、体重が2,500g以上になるまでは特別の看護体制下で保育されるのが通例である。これは、出生時体重が小さいほど、新生児期における死亡率が高く、或いは、様々な病気を起こしやすい、又、その後の発育にも問題があることが多いからである。(平山宏宗等編「育児全書」、126～128頁、昭和52年社会保険出版社発行) 又、瘦身者については、20代では標準者及び肥満者よりも有意に死亡指数が高い、年齢層に関係なく、入院率は瘦身者が最も多い、瘦身者の方が肥満者より骨折しやすい等の報告がある。(森川憲博等著「肥満児とやせ児」、24～30頁、昭和58年2月28日株式会社きょうせい発行) 上記事情は、程度の差こそあれ、本質的に人間以外の動物であっても同様であると推定される。加えて、人間の食に供される牛、豚、魚等の場合には、その発育状況により商品価値は決まり、又、育成期間が短い程経営効率はよくなる。このように、出生時及びその後のにおいても、人間及びその他の動物において発育促進の必要が生じることがある。現在、この発育は主として栄養摂取量の増加により達成を意図されているが、食欲のない者に摂取を強制するとかえって食欲を害し、好ましい結果は得られない。又、摂取効率には個体差がある。そのため、人間以外の動物、例えば肥育牛においてはホルモン剤、非ホルモン剤が発育促進剤として与えられており、この場合、飼料を節減するという効果の達成も意図されている。しかし、ホルモン剤は副作用、体内残留性の点から使用が差し控えられており、又、非ホルモン剤は、一部が商品化されているにすぎない。(土屋平四郎等著「改訂・肉牛飼養全書第2版」、179～181頁、昭和63年社団法人農山漁村文化協会発行) 従って、人間及びその他の動物の健康体を回復、維持する手段、及び、より経済的に食肉を提供する手段としての発育促進剤開発の要請が存在しており、副作用や体内残留性の問題がなく、安価で投与方法が簡便な薬剤の開発が強く待たれている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、新規な発育促進剤、動物用発育促進剤を提供することを技術的課題とするものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】前記技術的課題は、優れた発育促進効果を有し、未熟児の誕生を予防し、副作用や体内残留性の問題がなく、長期使用が可能であり、生産コストが安く、しかも、経口、経皮、薬浴、注射いずれの経路でも投与が可能な、大量に供給可能なLPSを含む発育促進剤、動物用発育促進剤を提供することにより達成される。この発育促進剤、動物用発育促進剤には、インビトロで培養されるマクロファージのTNF産

生能を活性化するLPSのマクロファージ活性化能を指標とし、縦軸に、そのLPSを添加しないときのマクロファージのTNF産生量を与えるマクロファージ活性化能を0%、マクロファージのTNF産生量を最大かつ一定の値(本明細書の他の箇所においては、「最大恒量」と称す)にする時のLPSのマクロファージ活性化能を100%とするマクロファージ活性化能(%)を表し、横軸に、そのLPSのリムラステスト陽性LPS含有量を対数尺で表すシグモイド曲線を描くとき、マクロファージ活性化能のED<sub>50</sub>。を与えるリムラステスト陽性LPS含有量が0.4～100ng/培養液mlであるLPSの少なくとも1種が含まれる。ここで「少なくとも1種を含む」とは、本発明のLPSは各別に使用できることはもちろん、その意図される用途が阻害されない限り、それらの2種以上を任意に組み合わせ、又、更には他のいずれの物質とも組み合わせ使用できることを意味する。例えば、他の発育促進剤、ビタミン剤等のいわゆる栄養剤その他と配合することもある。

【0005】「マクロファージ」は、免疫担当細胞の一種であり、動物体内のほとんど全ての組織に分布し、粒子状の異物や体内の老廃細胞などを捕食して消化する大型のアメーバ状細胞の総称である。「TNF」は、マクロファージより産生される腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor)の総称であり[1985年に発行されたザジャーナルオブバイオロジカルケミストリー(The Journal of Biological Chemistry, 260, 2345～2354頁)、マクロファージの活性が高まるにつれてその産生量は増していく。「リムラステスト」は、1968年にレヴィン(Levin)が創案した、カプトガン血球抽出液と発色合成基質を用いたエンドキシン定量法である。本発明の発育促進剤、動物用発育促進剤の活性成分として使用できるLPSは、特にその採取源、生産方法、精製方法を限定することはない。例えば、細菌や植物から採取されるLPSであっても、或は合成リポドAのような合成品であってもよい。なお、本明細書、特にその特許請求の範囲において、採取源は特に名称で特定されたものに限定されることなく、その採取源の成長、保存、流通の過程で付着、共存する細菌その他の全てのもが含まれる。例えば、「小麦LPS」と特定された場合には、小麦のものから採取されたLPSのみならず、小麦の成長、保存、流通の過程で付着、共存する細菌その他の全てのもが含まれるものと理解されたい。なぜなら、特に寄生、共生植物、寄生、共生動物という関係が解明されているもの以外にも、特定の植物、動物、菌界生物、地衣界生物に、それらにより付着、共存を許されたものが棲息している例が多く存在し得ることは当業界で良く知られていることであるからである。

【0006】これらLPSのうちから、本発明の発育促

進剤、動物用発育促進剤の活性成分として使用できるLPSを選択するには、インビトロで培養されるマクロファージのTNF産生能を活性化しLPSのマクロファージ活性化能を指標とし、縦軸に、そのLPSを添加しないときのマクロファージのTNF産生量を与えるマクロファージ活性化能を0%、マクロファージのTNF産生量を最大恒量にする時のLPSのマクロファージ活性化能を100%とするマクロファージ活性化能(%)を表し、横軸に、そのLPSのリムラステスト陽性LPS含有量を対数尺で表すシグモイド曲線を描くとき、マクロファージ活性化能のED<sub>50</sub>。を与えるリムラステスト陽性LPS含有量が0.4~100ng/培養液mlであるものを選択すればよい。

#### [0007] リムラステスト陽性植物源LPS

原料植物として使用できるものを下記に例示する。なお、本明細書に記載した植物が属する科名、属名は、次の文献の記載を照合して決定された。

裸子植物、単子葉類、双子葉類、シダ植物、ソウ類：昭和57年(正編)、昭和58年(続編)に北隆館から発行された「原色牧野植物大図鑑」の記載を照合して所属を決定した。但し、「燕麦」は、昭和45年に女子栄養大学出版部から発行された「食用植物図説」と、昭和58年に至文堂から発行された「新日本植物誌頭花篇」の記載を照合し、「裸麦」は、昭和46年に東京同文書院から発行された「総合食品事典」の記載を照合し、「鳩麦」、「カラスビシャク」、「ジャノヒゲ」、「ウコン」、「マタタビ」、「アマチャヅル」、「ドクダミ」、「胡椒」、「トウガラシ」、「ダイウイキョウ」、「ダイダイ」、「クズ」、「ナンキンソウ」、「オタネニンジン」、「ボウフウ」、「オオツツラフジ」、「ウンカリア・ヒルスタ」は、昭和63年に北隆館から発行された「原色牧野和漢薬草大図鑑」の記載を照合し、「アボガド」は、昭和53年に財団法人農林統計協会から発行された熱帯農業技術叢書第15号「ブラジルの果実」の記載を照合し、「カイワレダイコン」は、昭和59年に北隆館から発行された「原色園芸植物大図鑑」の記載を照合し、「ニクズク」は、昭和44年に廣川書店から発行された「図説熱帯植物集成」の記載を照合し、「クロレラ」は、財団法人日本健康食品協会が昭和61年に公示した、「クロレラ規格基準」の記載を照合して所属を決定した。

菌類：昭和62年に保育社から発行された「原色日本新菌類図鑑」の記載を照合して所属を決定した。但し、酵母は、昭和37年に技報堂から発行された「微生物学ハンドブック」の記載を照合し、「冬虫夏草」は、前掲の「原色牧野和漢薬草大図鑑」の記載を照合して所属を決定した。

本発明で使用できる原料植物は、例えば、裸子植物、単子葉類、双子葉類、シダ植物、ソウ類、菌類の植物であり、これらは個別に或は混合して使用できる。裸子植物

としては、例えば、マツ科マツ属植物であるマツを使用できる。単子葉類植物としては、例えば、イネ科イネ属植物であるイネ、イネ科コメ属植物である小麦、イネ科オオムギ属植物である大麦、裸麦、イネ科カラス麦属植物である鳥麦、燕麦、イネ科ササ属植物であるクマ笹、イネ科ジューズダマ属植物である鳩麦、アヤメ科アヤメ属植物であるアヤメ、ユリ科ネギ属植物であるニンニク、ユリ科ユリカキ属植物であるアスパラガス、ユリ科ジャノヒゲ属植物であるジャノヒゲ、ショウガ科ショウガ属植物であるミョウガ、ショウガ科ウコン属植物であるウコン、サトイモ科ハング属植物であるカラスビシャクを使用できる。双子葉類植物としては、マメ科ダイズ属植物である大豆、マメ科インゲンマメ属植物である小豆、マメ科ソラマメ属植物であるそら豆、マメ科クズ属植物であるクズ、マメ科カンゾウ属植物であるナンキンカンゾウ、ナス科ナス属植物であるジャカイモ、トウガラシ、ナス科トマト属植物であるトマト、ナス科トウガラシ属植物であるトウガラシ、バラ科ビワ属植物であるビワ、バラ科サトモ科ハング属植物であるモモ、クスノキ科アボガド属植物であるアボガド、クルミ科クルミ属植物であるクルミ、ウリ科トウナス属植物であるカボチャ、ウリ科アマチャヅル属植物であるアマチャヅル、アブラナ科ダイコン属植物であるカイワレダイコン、マタビ科マタビ属植物であるマタビ、ドクダミ科ドクダミ属植物であるドクダミ、コショウ科コショウ属植物である胡椒、シキミ科シキミ属植物であるダイウイキョウ、ニクズク科ニクズク属植物であるニクズク、ミカン科ミカン属植物であるダイダイ、ウコギ科オタネニンジン属植物であるオタネニンジン、セリ科サボシュニコピア属植物であるボウフウ、ツツラフジ科オオツツラフジ属植物であるオオツツラフジ、アカネ科カギカズラ属植物であるウンカリア・ヒルスタを使用できる。シダ植物としては、例えば、トクサ科トクサ属植物であるスギナ、ゼンマイ科ゼンマイ属植物であるゼンマイを使用できる。ソウ類植物としては、例えば、カッソウ類植物、紅ソウ類植物、緑ソウ類植物、ランソウ類植物を使用できる。カッソウ類植物としては、例えば、コンボ科ワケメ属植物であるワケメ、コンボ科コンボ属植物であるコンボ、ホンダワラ科ヒジキ属植物であるヒジキを使用できる。紅ソウ類植物としては、例えば、ウシケノリ科アマノリ属植物であるアサクサノリを使用できる。緑ソウ類植物としては、例えば、オオシスチス科クロレラ属植物であるクロレラを使用できる。菌類植物としては、例えば、担子菌類植物、子嚢菌類植物を使用できる。担子菌類植物としては、例えば、ヒラタケ科マツオウシ属植物である椎茸、キシメジ科エノキタケ属植物であるエノキ茸、キシメジ科キシメジ属植物であるキシメジ、タコウキン科マイタケ属植物であるマイ茸、サルノコシカケ科ボロラス属植物であるアワビ茸、ハラタケ科ハラタケ属植物であるマッシュルーム、キクラゲ科キクラゲ属植物で

あるキクラゲ、モエキタケ科スギタケ属植物であるナメコを使用できる。子ノウ菌類植物としては、例えば、エンドミセタセア科サッカロミセス属植物であるパン酵母、醸造用酵母を使用できる。醸造用酵母にはビール酵母、清酒酵母、葡萄酒酵母、醬油酵母、味噌酵母等の他、サッカロミセス セレブシムに属する多くの酵母（例えば、ウイスキーや老酒の製造に使用される酵母）が含まれる。又、バカクキン科ノムシタケ属植物である冬虫夏草も使用できる。植物源LPSは、以下に述べる方法で分離、精製できる。

1) 原料植物を必要に応じて適宜細切、乾燥、粉砕した後に蒸留水によく懸濁し、上清を回収する。例えば、原料植物が穀類の種子である場合は、種皮をつけたまま、或は、種皮を除いた後に簡単に砕くか、又は、食用に供せられている程度の粉末になるまで粉砕し、得られた粉末に水を加えて分散液とし、攪拌した後に沈降物を静置又は遠心分離により除去するか、粉末に水を加えて練って得られるドウをミキサー中でゆるやかに水洗し、沈降物を除去すればよい。原料植物がクロレアである場合には、まず細胞膜を破砕し、エタノール洗浄により脂溶性物質を除去した後に水抽出する。この水抽出の際の原料植物の粒度、水の温度、液性、添加量、攪拌の速度、時間、遠心分離の際の条件等は特に制限する必要はなく、原料植物の種類に応じて適宜調整すればよい。又、抽出水の温度は高い方がLPSの採取量、純度ともに高い傾向があるが、操作の便宜上、原料植物に含まれる澱粉の糊化を招きたくない50℃以下とすることが好ましい。又、水の添加量は、原料植物の種類、粒度により異なるが、穀類種子の場合にはその割合が70w/v%以下、望ましくは20～50w/v%程度とすると操作上便利である。更に、攪拌の速度は、起泡を引き起こさない程度のものであることが好ましい。なお、この段階の操作迄で、本発明のリムラステスト陽性植物LPSの純度は、リムラステスト活性データから判断して、例えば小麦種子の場合には約30倍に上昇する。以下、穀類種子を原料として使用する場合を例にとり説明するが、いわゆる当業者であれば、以下の記載を参考にして、他植物から雑質する糖、蛋白等を除去してリムラステスト陽性LPSを高純度で回収する方法を実施することは極めて容易である。

2) 純度を更上げるためには、上記1)で得られた上清を常法に従って限外濾過に付して分子量5000以下の画分を除去すればよい。

3) 得られた乾燥品を、50mg/mlになるように蒸留水に懸濁し、遠心分離操作に付して上清を回収する。

4) この上清を氷水で冷却し、酸を添加して酸性にする。この際使用する酸は特定のものである必要はなく、例えば、トリクロロ酢酸（以下、TCAと称す）、過塩素酸、トリフルオロ酢酸、酢酸、ジクロロ酢酸が使用できる。

5) 次いで、遠心分離操作に付して沈殿を回収して蒸留水で洗浄し、再度遠心分離操作に付して沈殿を回収する。

6) 沈殿を蒸留水に懸濁し、沈殿が溶解するまでアルカリを加える。この際使用するアルカリも特定のものである必要はなく、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア、炭酸ナトリウム、酢酸ナトリウムが使用できる。沈殿の溶解時に塩基性がpH1より大きくなると目的のLPSが失活するので注意が必要である。

7) 次いで酸を加えてpH8としてから37℃に加熱し、更に酸を加えて酸性にする。この際使用する酸も特定のものである必要はない。

8) 上清を回収して氷冷し、4℃で再び遠心分離操作に付す。

9) 上清を回収し、アルカリを添加して中和し、常法に従って限外濾過で濃縮する。この際使用するアルカリも特定のものである必要はない。

10) 次いで常法に従ってゲル濾過に付して、リムラステスト陽性画分を回収して併せる。ゲル濾過用の担体としては、例えばセファデックス（Sephadex）G-75、G-100、セファクリル（Sephacryl）S-200、セファロース（Sephacrose）6B [以上は米国ファルマシア社（Pharmacia Inc.）製]、バイオゲル（Bioigel）P-100 [米国バイオラッド（Biorad Inc.）社製]、トーヨーパールHW-50、HW-55（東洋曹達工業社製）を使用できる。緩衝液はpH3～10のものならいずれでもよい。例えば、トリス-HCl又はリン酸緩衝液が使用できる。

11) 次いでこの画分に蛋白分解酵素を加え、37℃で2時間以上インキュベーションして残存蛋白質を分解し、得られた酵素処理液を常法に従って限外濾過により濃縮する。なお、この際に使用する蛋白分解酵素も特定のものである必要はなく、例えば、V8プロテアーゼ、キモトリプシン、トリプシン、サーモライシンが単独、或は任意に組み合わせ使用できる。市販品としては、例えば、プロナーゼE（科研化学社）、プロティネースK（メルク社）を使用できる。

12) 次いでこの画分を常法に従って、例えば、米国ファルマシア社製のFPLCシステムでファルマシア社製のモノQ-セファロース（Sephacrose）、Q-セファロース（Sephacrose）を使用して陰イオン交換クロマトグラフィーに付してリムラステスト陽性画分を得る。

13) 次いで、常法に従って脱塩のためにゲル濾過に付してリムラステスト陽性画分を回収する。

以上の操作により、小麦種子の場合には、当初のリムラステスト活性の約20%が回収され、純度約95%の精製標品

が得られる。又、段階1)終了時の純度に比べ約1000倍の純度(小麦種子の場合)になる。以上の方法によって得られたリムラステスト陽性植物上LPSはそのまま、或いは任意の程度に濃縮した形で提供できる。又、保存性を高めるために、凍結乾燥や噴霧乾燥などの任意の手段により乾燥粉末として提供することもできる。これらはいずれも常法で生産できる。

#### 【0008】リムラステスト陽性細菌源LPS

従来より知られている大腸菌LPS、アルカリゲネスラディオバクター(A. radiobacter)から得られるLPS[ビー、エイチ、グラハム(P. H. Graham)、エム、エイ、オーブリエン(M. A. O'Brien)共著、"アントニック ファン リーウヴェンホック(Antonie van Leeuwenhoek), vol. 34, 326~330頁(1968年):本明細書の他の箇所では、A. ラディオバクターLPSと称す]、百日咳菌LPS、リビダA等の他、本明細書で述べて詳述する細菌源LPS1、LPS2、LPS3及びそれらの合成LPSが該当する。大腸\*

#### 小麦粉の名称

- ①ダーク・ノーザン・スプリングス
- ②1・カナディアン・ホイート
- ③ハード・レッド・ウィンター・セミハード
- ④オーストラリアン・スタンダード・ホイート
- ⑤ホロシリ

#### 産地

- 米国
- カナダ
- 米国
- オーストラリア
- 日本

上記細菌からLPS1、LPS2、LPS3を分離するには、ウェストファル(Westphal)等が「メソックス・カーボハイドレート・ケミストリー(Methods in Carbohydrate Chemistry) vol. V [米国ニューヨークのアカデミック・プレス(Academic Press)社が1965年に発行]の83頁に記載した熱フェノール法を用い、更に、陰イオン交換樹脂で精製すればよい。即ち、菌体を蒸留水に懸濁した後、蒸留水と等容量の熱フェノールと共に攪拌し、次いで、遠心分離により水層を回収し、この水層を透析に付してフェノールを除去し、限外濾過により濃縮して粗LPS画分を得、この画分を常法に従い、例えば、ファルマシア社製のFPLCシステムでファルマシア社製のモノQ-セファロース(Sepharese)、Q-セファロース(Sephacrose)を使用して陰イオン交換クロマトグラフィーに付して精製し、更に、常法に従って脱塩すればよい。以上の操作により、純度96%以上の精製標品が得られる。原料中のリムラステスト陽性LPSの検出、含量測定は、後記実験例1に詳述する通り、例えば、生化学工業株式会社からトキシカラシシステムという名称で市販されている試薬セットを使用して実施できる。即ち、原料植物を同システムのLS-1セットと合わせて発色させ、その発色の強さを、同じく同セットのE1-2セットを使用して作成した検量線と対比させればよい。糖は

\*菌LPSは、例えば、米田ディフコ(Difco)社から市販されている。百日咳菌LPSは、例えば、フナコシ薬品(日本)から市販されている。又、公知の百日咳菌、例えば、東浜株1相菌の死菌体から、例えば、下記文献記載の公知方法により調製することもできる。ウェブスター(Webster)等著の「ジャーナル・オブ・イムヌロジー(Journal of Immunology)、744、55(1955):ウェストファル(Westphal)等著の「ツェット、ナチュールフォルシュ(Z. Naturforsch)」、76、148(1952)。リビダAは、例えば、第一化学薬品から市販されている。上記菌源LPS1、LPS2、LPS3をそれぞれ産生する3種の菌は、本発明者等が検討した小麦からはその産地、種類を問わず分離されている。従って、いずれの産地、種類の小麦及びその加工品からも分離されたと推定される。本発明者等がそれら3種の細菌を分離できることを確認した小麦粉の産地、種類は次の通りである。

フェノール-硫酸法[エム、デュボイス(M. Dubois)等著、アナリティカル・ケミストリー(Analytical Chemistry)、vol. 28、350頁、1956年]で、蛋白はローリー法[オー、エイ、ローリー(O. H. Lowry)等著、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry)、vol. 193、65頁、1951年]で測定した。

#### 【0009】LPSがマクロファージのインビトロTNF産生能を活性化する能力の測定方法

動物体内にTNFを産生させるためには、産生前駆(ブライミング)段階と産生開始(トリガリング)段階とが必要であることは、カーズウェル(Carswell)らにより、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・サイエンス・オブ・ユースエー[Proceeding of National Academy Science of USA.、72、3666~3670頁(1975年)]に報告されている。ブライミング段階開始のために投与される薬剤が「ブライマー」(内因性TNF産生促進剤)であり、トリガリング段階開始のために投与される薬剤が「トリガー」(内因性TNF産生剤)である。LPSがマクロファージのインビトロTNF産生能を活性化する能力を測定するには、マウスのマクロファージ腹腔常在細胞を採取し、これにブ



ライマーとしての組み換えマウスIFN- $\gamma$ を添加し、次いで、トリガーとしてのLPSを添加し、そのTNF活性を測定すればよい。TNF活性は、L-929細胞【ブローディング オブ ナショナル アカデミーサイエンス オブ ユーエスエー 72, 3666~3670頁】に対する細胞毒性を基にして、次のようにして測定する。L-929細胞を、5%仔牛胎児血清を加えたイーグルミニマムエッセンシャル培地（以下、MEM培地と表す）で育成し、 $8 \times 10^4$ 個の細胞が100  $\mu$ lの同上培地に含まれるようにし、96穴の平底プレートで育種する。育種条件は37℃、2時間、5%CO<sub>2</sub>であり、通常の細胞培養に用いられる方法でよい。その後、アクトノマイシンDを培地中に終濃度1  $\mu$ g/mlとなるように加え、培養液の液量を150  $\mu$ lとする。即座に、検体を適当にMEM培地で希釈したものを50  $\mu$ l加える（この際希釈率を適宜調整し、ED<sub>50</sub>を求められる）。更に、最終液量200  $\mu$ lとなったL-929細胞を上記条件で18時間培養する。細胞障害活性を測定するには、まず全培地を除去し、ついで、0.1%クリスタルバイオレットを含む1%メチルアルコール溶液を加えて固定染色する。クリスタルバイオレットは全有核細胞を染色するが、死細胞は染色後にプレート底面より水洗で除去されるので、生存細胞の結果から細胞障害活性を直接測定できる。この染色度をOD（590nm）での吸光度を指標として測定し、対照群に対する染色度と比較することで細胞障害活性を測定する。活性の定義は次の様に行う。L-929細胞が50%生存できる検体の希釈率（N）を求める。対照としてウサギTNF- $\alpha$ （旭化成株式会社から入手した組換えヒト型TNF）を用いて決定する。このウサギTNFのED<sub>50</sub>を $x$ と与える希釈率（C）を求める。検体活性（単位/ml）はN/C  $\times$  nで計算する。

#### 【0010】提供できる剤の製造方法

本発明の発育促進剤は、常法の製剤技術により、散剤、顆粒剤、丸剤、錠剤、トローチ剤、カプセル剤、液剤、貼付剤、軟膏剤、リニメント剤、ローション剤、坐剤、注射剤、薬液剤等の形態で提供できる。又、動物用としては、更に、飼料添加剤、プレミックス製剤、飼料添加剤として調製することもできる。飼料添加剤とする場合には、粉剤が顆粒剤とすることが好ましい。又、プレミックス製剤とは、飼料との混合を容易にするために微粉などの飼料成分で希釈されたものを指す。本発明の発育促進剤を飼料添加剤、プレミックス製剤として添加できる飼料は市販されている飼料のいずれでもよい。又、ミネラル、ビタミン、アミノ酸等の飼料添加剤を含む飼料であってもよい。これら製剤には、所望ならば、保存性、均質性を保持するために、常法により賦形剤、保存

剤、緩衝剤等の添加剤を加えることもできる。更に、矯味剤、矯臭剤、着色剤を含めることもできる。賦形剤としては、例えば、乳糖、デンプンが使用できる。保存剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル等のパラオキシ安息香酸エステル類、デヒドロ酢酸ナトリウム、フェノール、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン等が使用できる。緩衝剤としては、例えば、クエン酸塩、酢酸塩、リン酸塩等が使用できる。

#### 10 【0011】発育促進効果の確認

本発明の発育促進効果は、マウスに投与し、増体効果を調べることにより確認した。以下、実施例、製造例、実験例により、本発明を更に詳細に説明する。なお、それらで使用された「大腸菌LPS」は、米国ディフコ（Difco）社製0128:B8である。

#### 【0012】製造例1（小麦LPSの製造）

- 1）小型ニードに、1.09%の灰分を含む硬質小麦粉（アメリカ又はカナダ産のハードレッドスプリング）（3.120g）を入れ、2.03リットルの蒸留水を加えて10分間練ってドウトした。15分間の静置後に10リットルの水を加えてゆるやかに攪拌してデンプン乳液を洗い出し、同時に可溶性成分を溶出させた。この溶出液を5℃の冷蔵庫中で12時間静置した後、デンプン等の沈降部を除去した。上清を凍結乾燥して201.1gの粉末を得た（粉末A）。更に、残留ドウに3リットルの蒸留水を加えてゆるやかに攪拌し、以下、上記と同様に処理して40.1gの粉末を得た（粉末B）。
- 2）これら粉末A、Bを米国アミコン社製限外濾過機HF-Lab1に供し、分子重量分5,000については中空系カートリッジHF-Lab1PM5を、分子重量分10,000については中空系カートリッジHF-Lab1PM10を取り付けて限外濾過を行った【温度5~10℃。入圧25psi（1.76kg/cm<sup>2</sup>）。出圧15psi（1.06kg/cm<sup>2</sup>）】。その結果に基づき各部分を次のように命名した。

粉末A：分子量5,000以下の部分をa<sub>1</sub>

分子量5,000以上の部分をa<sub>2</sub>

粉末B：分子量5,000以下の部分をb<sub>1</sub>

分子量5,000以上の部分をb<sub>2</sub>

- 40 粉末A：分子量10,000以下の部分をa<sub>1</sub>

分子量10,000以上の部分をa<sub>2</sub>

粉末B：分子量10,000以下の部分をb<sub>1</sub>

分子量10,000以上の部分をb<sub>2</sub>

これら各部分を後記実験例1に詳述する方法に準拠してリムラステストに付したら、分子量5,000以上の画分には多量のリムラステスト陽性成分が存在するが、分子量5,000以下の画分にはほとんど存在しないことが確認された。

- 3）上記粉末a<sub>2</sub>の30gを1リットル三角フラスコに入れ、600mlの蒸留水を加えて、60分間スター

て攪拌した後、日立冷却高速遠心機SCR-20B(ローターRPR16を事前に4℃に冷却しておいた)で4℃で遠心分離操作(10,000G×10分)に付して上清を回収した。

4) この上清を1リットル三角フラスコに入れ、氷冷下(液温約2℃)、スターラーで攪拌しながら、事前に2℃に冷却してあった100%TCA水溶液2.5mlを滴下し、滴下終了後氷水中に10分間放置した。

5) 次いで前記と同様にして4℃で遠心分離操作(10,000G×10分)に付して沈殿を回収し、氷水中で冷却下、300mlの蒸留水と共に500mlのビーカーに入れて懸濁し、氷水中で冷却し、前記と同様にして4℃で遠心分離操作(10,000G×10分)に付して沈殿を回収した。

6) この沈殿を1リットルビーカーに入れ、蒸留水500mlで懸濁し、1N水酸化ナトリウム溶液約3.5mlを使用して中和(pH7)し、ついで、氷水中で冷却しながら、1N水酸化ナトリウム溶液約2mlを添加して0.02N水酸化ナトリウム溶液になるようにして沈殿を溶解した。

7) 1N塩酸約1.5mlを加えてpH8とし、次いで100mlの蒸留水を加えた後に1リットル三角フラスコに移して37℃のインキュベーター内で30分間ゆっくり振とうした。

8) 100%TCA水溶液30mlを加えて混合した後、37℃のインキュベーター内で10分間ゆっくり振とうしてから、約37℃に保温した遠心分離器トミーCD100R(トミー精器社製)を使用して遠心分離操作(3,000G×10分)に付した。

9) 上清を回収して氷冷し、4℃で遠心分離操作(10,000G×10分)に付した。

10) 上清を回収して10N水酸化ナトリウム溶液約3.6mlで中和してpH7とし、限外濾過器(東洋濾紙UHP-150、フィルター:UK-10、N<sub>2</sub>圧:4.0kg/cm<sup>2</sup>)で濾過した。

11) 得られた濾液60mlを、セファロース(Sepharose)6Bカラム[米国ファルマシア社(Pharmacia Inc.)製、カラムサイズ:5cm(内径)×100cm(2リットル)]を使い、ゲル濾過[緩衝液:10mMトリス-HCl/10mMNaCl(pH7.5)、流速:60ml/時]に付して、各20mlの画分を得た。

12) 初めから43番目から56番目の画分280mlを併せ、ブローゼE(科研化学社)450μgを加え、振とう下、37℃に2時間保温した後に、限外濾過器(東洋濾紙UHP-62、フィルター:UK-10、N<sub>2</sub>圧:4.0kg/cm<sup>2</sup>)で濾過した。次いで、ファルマシア社製FPLCシステム(カラム:モノQHR10/10)を使って陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。即ち、10mMトリス-HCl(pH7.

5)と10mMのNaClを含む緩衝液で試料をカラムに付した後、上記緩衝液でNaCl量が165mMに増加された組成を持つ緩衝液(200ml)でカラムを洗った。次いで、NaCl濃度を、165mMから1MのNaCl濃度勾配になるように増加させながら全量400mlで目的LPSを溶出させ、各2mlの画分を回収した。リムラステスト陽性が確認された、濃度勾配をかけてから5〜8番目の画分を併せて、LPS純度約92%の8ml[LPS:3.03mg(後記実験例1記載の方法で測定したリムラステスト陽性LPS換算値である。以下のLPS量も全てこの換算値である)、糖:0.23mg、蛋白:0.04mg]を回収した。

13) 次いでその8mlを、セファデックス(Sephadex)G-25[カラム:2.0cm(内径)×20.2cm(66ml)]を使ってゲル濾過(緩衝液:水)に付して各3mlの画分を回収した。リムラステスト陽性の確認された第9〜12番目の画分を併せて、LPS純度約95%の12ml(LPS:2.7mg、糖:0.18mg、蛋白:0.03mg)を回収した。

20) なお、この画分は、陰イオン交換クロマトグラフィーにより酸性であることを確認した。

14) 上記画分を-80℃で凍結後に恒量になるまで凍結乾燥し、重量を測定したら0.75mgあった。(以下、この凍結乾燥標品を小麦LPSと称す)この小麦LPSのリムラス活性を後記実験例1記載の方法で測定したら2.7mgに相当するので、その比活性は、2.7÷0.75=3.6になる。また、灰雑物として存在し得る単独の糖は、以上の精製により実質上全て除去されたと考えられるので、検出された糖は全て、小麦LPSを構成している糖と考えられる。従って、この段階での小麦LPSの純度を重量に基づいて計算すると蛋白=0.03mg

LPS=0.75-0.03=0.72mgだから、 $0.72 \div 0.75 \times 100 = 96(\%)$ である。

#### 【0013】小麦LPSの物性

##### 15) 分子重

小麦LPSを蒸留水に溶解して1mg/ml溶液を調製し、その4μlを1.5mlのレフチューブに入れた。これに、別途、1mMのEDTAに2.5%SDS、5%メルカプトエタノール、10mMトリス塩酸(pH8.0)を加えて調製したSDS処理液1μlを加え、この混液を3分間沸騰水に浸した。ファルマシア社製のファストシステム(Phast System)を使用し、電極との間にSDS-バッファー ストリップ(Buffer Strip)(ファルマシア社製)が介在せられた1μlの上記混液をゲル[ファルマシア社製のファスト ゲル グラジエント(Phast Gel Gradient 8-25)]に塗布し、最

大電圧250V、最大電流10mAにセットして泳動を開始させた(本明細書でこの泳動法をSDS-1法と称する)。泳動終了後、クマシー染色と銀染色における挙動を観察した。クマシー染色では、染色液としてファルマシア製の0.1%ファストゲルブルー(Phast Gel Blue)Rを、脱色液として、メタノール:酢酸:蒸留水(容量比3:1:6)混液を使い、次の順序で染色・脱色した。

- 1: 50℃で8分間染色
- 2: 50℃で5分間脱色
- 3: 50℃で8分間染色
- 4: 50℃で10分間脱色
- 5: 50℃で5分間保護(グリセロール、酢酸、蒸留水の容量比5:10:85混液)
- 6: 乾燥

銀染色は、次の順序で行った。

- 1: 50℃で2分間、洗浄液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比5:1:4混液)で処理
  - 2: 50℃で2分間、洗浄液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理
  - 3: 50℃で4分間、洗浄液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理
  - 4: 50℃で6分間、増感液(8.3%グルタルジアルデヒド)で処理
  - 5: 50℃で3分間、洗浄液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理
  - 6: 50℃で5分間、洗浄液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理
  - 7: 50℃で2分間、洗浄液(脱イオン水)で処理
  - 8: 50℃で2分間、洗浄液(脱イオン水)で処理
  - 9: 40℃で13分間、0.25w/v%硝酸銀で処理
  - 10: 30℃で30秒間、洗浄液(脱イオン水)で処理
  - 11: 30℃で30秒間、洗浄液(脱イオン水)で処理
  - 12: 30℃で30秒間、現像液(0.04v/v%ホルムアルデヒド+2.5w/v%炭酸ナトリウム洗浄液)で処理
  - 13: 30℃で4分間、現像液(0.04v/v%ホルムアルデヒド+2.5w/v%炭酸ナトリウム洗浄液)で処理
  - 14: 50℃で2分間、反応停止液(5%v/v%酢酸)で処理
  - 15: 50℃で3分間、保護液(酢酸、グリセロール、蒸留水の容量比10:8:85混液)で処理
  - 16: 乾燥
- LPSは銀染色に染まるが、クマシー染色には染まらない性質を利用して染色帯を観察したら、分子量8,000±1,000の位置に小麦LPSの主要染色帯が検出された。別途、小麦LPSを蒸留水に溶解して2mg/ml溶液を調製し、その10μlを1.5ml容量プラスチックチューブに入れた。これに、別途、180μlの

10% (w/v) SDS、45μlの5%β-メルカプトエタノール、90μlのCBB色素溶液、112.5μlの0.5Mトリス塩酸(pH6.8)及び22.5μlの蒸留水を加えて調製したSDS処理液10μlを加えてよく混合し、次いで5分間沸騰水浴中に浸し、この加熱後直ちに氷水中に浸して急冷した。10mlの10% (w/v) SDS、17.9gのトリソリン及び3.03gのトリスを1リットルの蒸留水に溶解して調製した泳動緩衝液をマリソル社製のスラブゲル電気泳動槽に入れた。20%ポリアクリルアミドゲルを泳動槽に固定し、サンプル溝に検体を入れ、電圧を50Vに1時間、次いで、150Vに固定して、色素がゲルより溶出するまで泳動を続けた(本明細書においてこの泳動法をSDS-2法と称する)。泳動終了後に、バイオラッド社の銀色キット161-0443を使い銀染色を室温で行って、挙動を確認した。結果、分子量8,000±1,000、5,000±2,000の位置に小麦LPSの主要染色帯が検出された。なお、SDS-1法、SDS-2法で、小麦LPSと同時に泳動させた蛋白分子量マーカーは、ファルマシア社製のLMWキットE[ホスホリラーゼb(94k)、アルブミン(67k)、オプアルブミン(43k)、カーボニックアンヒドラーゼ(30k)、トリプシンインヒビター(20k)、α-ラクトアルブミン(14k)]、ペプチド分子量マーカーは、ファルマシア社製の1860-101分子量マーカー[ミオグロビン(16.9k)、ミオグロビンI&II(14.4k)、ミオグロビンI(8.2k)、ミオグロビンII(6.0k)、ミオグロビンIV(2.5k)]であった。

### 30 16) リン含有量

チェン・トリバラ(Chen-Toribara)法[チェン等著、「アナリティカルケミストリ(Analytical Chemistry)」, vol. 28, 1756~1758頁(1956年)に準拠して次の通りに行った。小麦LPSを蒸留水に溶解して、25μgの小麦LPSを含む20μlの溶液を調製し、小試験管に入れた。20μlの50v/v%硫酸を添加し、160℃で2時間加熱した。次いで、20μlの10v/v%過塩素酸を添加した後にガスバーナーで1分間加熱して灰化させた。その後0.5mlの蒸留水、次いで0.5mlの反応試薬(1mlの6N硫酸、2mlの蒸留水、2mlの2.5v/w%モリブデン酸アンモニウム及び1mlの10v/w%のアスコルビン酸を混合して調製し、その0.5mlを使用)を添加して室温で30分間放置した後に、820nmでの吸光度(OD<sub>820nm</sub>)を測定した。なお、検量線作製用の試料としては、リン酸二水素カリウム(和光純薬社製)を蒸留水で希釈し、リン重量としてそれぞれ2.5μg、1μg、0.25μg、0.0μgを含む0.5mlの溶液を調製して使用した。なお、リン1gはリン酸二水素カリウ

μ4. 39 gに相当する。得られた結果を表1に示す。 \* [表1]

[0014]

\*

OD <sub>620nm</sub>	検 体
	リン酸二水素カリウム (リン換算値: μg)
0.002	0
0.150	0.25
0.620	1.0
1.559	2.5
	小麦LPS (4検体) (検量線から計算した リンの重量: μg)
0.036	0.1
0.073	0.2
0.104	0.3
0.139	0.4

[0015] 表1において、小麦LPSのデータは、無機リンの混入(例えば、リン酸緩衝液に由来する)による誤差を避けるために、加熱処理をしていない対照のデータを減じた値である。小麦LPSの分子量を8,000と仮定し、上表の結果に基づいてその1分子当たりのリン数を次式により計算すると1~4になる。

[0016]

[数1]

$$\text{リン重量} \times 10^{-6} \times \frac{\text{分子量}}{25 \times 10^{-6}} \times \frac{1}{32}$$

[0017] 上記実験でリン数が1~4と変動している原因の1つとしては、精製段階でのモノフォスフォエステラーゼ混入で、リン酸が脱離したことも考えられる。

17) ヘキサミン含有量

エルソン-モルガン (Elson-Morgan) 法 (東京化学同人出版「生化学実験講座」No. 4の377~379頁) に準拠して次の通りに行った。小麦LPSを蒸留水に溶解して1mg/mlの溶液を調製し、その100μlをスクリュウキャップ付きスピッツ (イワキガラス社製) に入れ、これに100μlの8N HClを添加して110℃で16時間加熱した。4N NaOHを約200μl添加してpH7とした。その100μlを分取し、別のスクリュウキャップ付きスピッツに入れ、200μlの下記試薬Aを加えた後に、105℃で

1.5時間加熱し、次いで流水で冷却した。次いで、100μlを分取し、670μlの96%エタノールを加え、更に、67μlの下記試薬Bを加えた後に室温で1時間放置し、535nmで吸光度を測定した。検量線作製用試料としては0.20~200μg/mlのN-アセチル グルコサミン (和光純薬社製) を使用した。

(試薬A) 75μlのアセチルアセトンと2.5mlの1.25N炭酸ナトリウムを混合して調製。

(試薬B) 1.6gのp-ジメチルベンズアルデヒドと30mlの濃塩酸と30mlの96%エタノールを混合して調製。

結果、小麦LPSのヘキサミン数は6±2/分子(仮定分子量8,000)だった。

18) 脂肪酸含有量

90μlの小麦LPS蒸留水溶液 (1mg/ml) に10μlの内部標準 (0.55mMのマलगリン酸) を加えた。1.0mlの0.5Mナトリウムメチラートを加えて脂肪酸エステルの加水分解とエステル化を行った。室温で1時間放置後に960μlの0.5N HClを加えて中和した。これに2mlのヘキサンを加えて15分間激しく攪拌した。次いで、1.000gで5分間遠心分離を行いヘキサン層を分取した。窒素ガスでヘキサンを蒸発させて、約20μlになるまで濃縮した。このサンプルをガスクロマトグラフィー [本体: 島津社製のGC8APF、キャピラリーカラム: カナダのスベルコ

(Speilco)社製FSCAP Sp2330、キャリヤーガス：窒素]に付して脂肪酸量を測定した。脂肪酸量測定の基準としては、第一化学薬品社製の合成リピドである大腸菌型LA-15-PP(分子量2,000で、1分子中の脂肪酸数は6であることが知られている)を用いた。結果、小麦LPSの脂肪酸数は $6 \pm 2$ /分子(仮定分子量8,000)であると推定された。上記ガスクロマトグラフィーで観察されたチャートを添付の図1~図3に示す。図1は小麦LPSの、図2は大腸菌LPSの、図3は百日咳菌LPSのチャートである。図1~図3において、図示されている主要ピーク番号に対応する保持時間(分)は次の通りであった。

図1: <u>ピーク番号</u>	<u>保持時間(分)</u>
1	2.450
2	2.758
図2: <u>ピーク番号</u>	<u>保持時間(分)</u>
1	2.417
2	2.742
図3: <u>ピーク番号</u>	<u>保持時間(分)</u>
1	2.433
2	3.028

図1~図3の比較により、小麦LPSのチャートは大腸菌LPSのチャートに似ているが、百日咳菌LPSのものとは大きく異なることは明白である。

#### 19) KDO含有量

KDO(2-ケト-3-デオキシオクトネート)含有量をジフェニルアミン法[シャビ アール(Shaby R.)等著、アナリチカル バイオケム(Analytical Biochem.), 58(1), 123~129頁(1974年)]に準拠して次の通りに行った。500mgのジフェニルアミン、5mlのエタノール、45mlの水酢酸、50mlの濃塩酸(全て和光純薬社製)を合わせてKDO抽出試薬を調製した。その500μlに、1.05mg/mlの小麦LPSを含む蒸留水250μlを合わせ、100℃の沸騰水浴中で30分間加熱後に冷水(23℃)中で30分間冷却し、ついで日立分光光度計320を使って420、470、630、650nmでの紫外外吸収を測定した(測定値をそれぞれA420、A470、A630、A650とする)。標準試料としては、127μg/mlのKDOアンモニウム塩[米国シグマ(Sigma)社製]を含む蒸留水250μlを使用した。検体試料、標準試料それぞれについて、次式の値を求めた。

$$S = A420 - A470 + A630 - A650$$

検体試料の値 ( $S_T$ )は0.379、標準試料の値

( $S_s$ )は0.294であった。この値の比較により、

小麦LPSには5±1モル/分子量8千のKDOが含まれると推定された。

#### [0018] 製造例2 (クロレラLPSの製造)

1) 細胞膜破砕クロレラ(株式会社マンナンフーズ製)

30gを、洗浄液が緑色に着色しなくなるまでエタノールで洗浄した。

2) この洗浄残渣26gを100mg/mlの濃度で蒸留水に溶かし、45℃で2時間振とう後に遠心分離操作(4℃, 10,000G×30分)に付した。

3) 上清を回収し、東洋濾紙No.2で濾過し、次いで蒸留水で抽出した。

4) 抽出液290mlを下記条件で陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。

10) カラム: Q-セファロース(φ3cm×23cm、容量約180ml)

緩衝剤: 10mMトリス-HCl(pH7.5)、NaCl濃度勾配: 10mM、400mM、1M

流速: 100~200ml/時

温度: 室温

5) 素通りした画分310mlをグルコアミラーゼで処理して澱粉を分解した(pH5.0、40℃、約2時間)。澱粉の分解は、ヨウ素澱粉反応で着色が生じないことにより確認した。

20) 6) 遠心分離(10,000G×10分)に付して上清を回収し、10NNaOH溶液で中和してpH7とし、分子量20万カットのポアサイズを有するウルトラフィルターを使って限外濾過して、分解物の除去及び濃縮を行った。

7) 得られた濃縮液30mlをファルマシア社製FPLCシステム(カラム: モノQHR10/10)を使って陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。即ち、10mMトリス-HClと10mMのNaClを含む緩衝液(pH7.5)で試料をカラムに付した後、上記緩衝液

30) 2) NaCl量が165mMに増加された組成をした液(200ml)でカラムを洗った。次いで、目的LPSを溶出するため、165mMから1MのNaCl濃度勾配になるようにNaCl濃度を増加させながら全量400mlでカラムを洗い、各2mlの画分の回収した。リムラステス陽性が確認された、濃度勾配をかけてから5~8番目の画分を併せた。

8) 次いでその8mlを、セファデックス(Sephadex)G-25[カラム: 2.0cm(内径)×20.2cm(66ml)]を使ってゲル濾過(緩衝液: 水)に付して各3mlの画分を回収した。リムラステス陽性の確認された第9~12番目の画分を併せて12mlを回収した(LPS: 14.3mg、糖: 2.0mg、蛋白: 0.53mg)。LPSは後記実験例1記載の方法で測定した。

9) 上記画分を-80℃で凍結後に恒量になるまで凍結乾燥し、重量を測定したら5.8mgあった。(以下、この凍結乾燥標品をクロレラLPSと称す)このクロレラLPSのリムラ活性は14.3mgに相当するので、その比活性は

$$14.3 \div 5.8 = 2.5$$

になる。また、以上の精製で、夾雑物として存在し得る単独の糖は実質上全て除去されたと考えられるので、検出された糖は全て、クロレラLPSを構成している糖と考えられる。従って、この段階でのクロレラLPSの純度を重量に基づいて計算すると、

蛋白=0.53mg

LPS=5.8-0.53=5.27mg なので、

5.27÷5.8×100=91(%)である。

#### クロレラLPSの物性

製造例1に記載の方法と同様にして、次の値が得られた。分子量は、SDS-2法により測定した。

主要分子量=40,000±90,000

リン数=4±1/分子量1万

ヘキサミン数=7±1/分子量1万

脂肪酸数=6±1/分子量1万

KDO数=2±1/分子量1万

#### 【0019】製造例3(百日咳菌LPSの製造)

千葉県血清研究所から入手した試験用百日咳菌液(2.0×10<sup>10</sup> 細胞/ml)を死菌体として用いた。上記死菌体を25mg(乾燥重量)/mlとなるように滅菌水に懸濁した。これに等量の90%熱フェノール液(68~70℃)を添加し、68℃で1時間振盪しながら抽出した。8,000G、4℃で20分間遠心分離して水層を分取した。残りのフェノール層に、上記水層と等量の滅菌水を加えて同様の抽出を行った。得られた水層を先の水層と合わせて流水中で一晚透析後に、ロータリーエポレータで1/10に濃縮した。これを8,000G、4℃で20分間遠心分離した。上清を分取し、酢酸ナトリウムを少量加え、0~4℃の冷エタノールを6倍量加えて-20℃で一晩放置した。4,000G、4℃で30分間遠心分離して回収した沈殿物をエタノールで2回、次いでアセトンで1回遠心洗浄し、アスピレータで乾燥させた。残さを、20mg/mlとなるように蒸留水に懸濁し、米国ブランソン(Branson)社製のソニファイア185型で超音波処理(出力コントロール5、15分、室温)に付した。次いで2,500G、4℃で10分間遠心分離し、上清を分取した。この上清を4℃で、米国シグマ(Sigma)社製の核酸分解酵素DNase I、RNase Aで15~16時間処理した(最終的には10μg/mlのDNase Iと、20μg/mlのRNase Aを使用した)。更に同じ濃度の核酸分解酵素を加えて37℃で2時間加熱した。次いで2,500G、4℃で10分間遠心分離し、上清を分取した。この上清を米国ゲルマン(Gelman)社のアクロディスク(Acrodisc)を使い、孔径0.2μmで濾過した。濾液を分子篩にかけ[樹脂:米国ファルマシア(Pharmacia)社製セファロース(Sephacrose)6B、カラムサイズ=内径5cm×長さ100cm、緩衝液=10mMのトリス-HCl、10mMのNaCl(pH7.5)、

流速=約3ml/cm<sup>2</sup>/時)]、生化学工業社製のLS-1キットを用いてリムラス活性陰性画分を調べて合わせ、上記ゲルマン社のアクロディスクを使い、孔径0.2μmで濾過した。濾液をイオン交換にかけ[装置:米国ファルマシア(Pharmacia)社製FPLC、樹脂:米国ファルマシア社製M-Q HR10/10、緩衝液=10mMのトリス-HCl+10mMのNaCl(pH7.5)で15分洗浄し、次いで、NaCl量を165mMに増加して30分洗浄し、次いで、20分かけて、NaCl量が165mMから1Mの濃度勾配になるようにNaCl量を増加させながら洗浄し、次いで、1MのNaClで30分洗浄する、流速=2ml/分]、生化学工業社製のLS-1キットを用いてリムラス活性陰性画分を調べて合わせた。合わせた画分をカラムで脱塩し[樹脂:米国ファルマシア(Pharmacia)社製セファデックスG-25ファイン(fine)、カラムサイズ=内径2cm×長さ25cm、溶出液=蒸留水]、次いで凍結乾燥した。この凍結乾燥標品(4.50mg)に混入している可能性の最も高い物質は核酸である。そこで、紫外吸収曲線(200~400nm)をとり、260nmでの吸光度を求めた。吸光度1のときの核酸濃度が50μg/mlであることを用いて上記吸光度から核酸濃度を算出したら1%以下であった。又、SDS-1法、SDS-2法のいずれによっても蛋白質は明確には検出されなかった。従って、検出感度を考慮すると、上記凍結乾燥標品に混入している蛋白質は高々0~3%と推定される。従って、上記凍結乾燥標品の純度は96%以上と推定された。製造例1に記載の方法と同様にして測定されたこの百日咳菌LPSの物性は次の通りであった。分子量はSDS-2法によって測定した。

#### 百日咳菌LPSの物性

主要分子量=6,000±1,000

リン数=4/分子量6千

ヘキサミン数=12/分子量6千

脂肪酸数=4/分子量6千

KDO数=2±1/分子量6千

【0020】なお、製造例1に記載の方法と同様にして測定された大腸菌LPS[米国ディフコ(Difco)社製O128:B8]の物性は次の通りであった。分子量はSDS-2法によって測定した。

#### 大腸菌LPSの物性

主要分子量=40,000±10,000

8,000±4,000

リン数=12/分子量3万

ヘキサミン数=45±6/分子量3万

脂肪酸数=18/分子量3万

KDO数=5±1/分子量3万

【0021】製造例4(LPS1、LPS2、LPS3の製造)

1) 50ml容コーニングチューブに、1.09%の灰分を含む硬質小麦粉(カナダ産の1・カナディアン・ホイート)1.04gを秤量して入れ、20mlの蒸留水を加えて50mg/mlの小麦粉液を調製した。

2) この液を37℃の水浴中で振とう培養し、培養開始後0時間、1時間、2時間、3時間、4時間、6時間、\*

1リットル中 酵母エキス  
ペプトン  
ブドウ糖  
カンテン  
pH

3) 種類が異なると考えられた、培養経過時間8時間目、10時間目に認められた黄〜クリーム色不透明コロニー(コロニー1)、クリーム色不透明コロニー(コロニー2)、黄色半透明コロニー(コロニー3)、乳白色不透明コロニー(コロニー4)、白色不透明な小さなコロニー(コロニー5)を上記と同種の別の標準寒天培地にまき、植え継ぎ、一方で、コロニー1〜5の細菌のグラム染色性、リムラス活性を調べた。上記コロニーのうち、コロニー4及びコロニー5(共にグラム染色性+)のリムラス活性はコロニー1〜3(共にグラム染色性-)に比べて極めて低かったため、以後の検討から除き、日水製薬社製の培地及びIDテスト・EB-20を使用し、コロニー1〜3の形態、生化学的性状を観察した。次の結果が得られた。

【0022】コロニー1を形成する細菌(識別番号: 900814-1)

組成1リットル中	肉エキス	5.0g
	胆汁酸塩	9.0g
	ペプトン	7.5g
	ラクトース	10.0g
	クエン酸ナトリウム	8.5g
	チオ硫酸ナトリウム	5.5g
	クエン酸第二鉄	1.0g
	ニュートラルレッド	0.025g
	ブリリアントグリーン	0.033g
	カンテン	13.5g

pH: 7.1 ± 0.1

3) TSI寒天培地: 斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成する。★ [TSI寒天培地: 日水製薬社コード番号: 0510]

組成1リットル中	肉エキス	5.0g
	NaCl	5.0g
	ペプトン	15.0g
	ラクトース	10.0g
	シュクロース	10.0g
	ブドウ糖	1.0g
	クエン酸第二鉄	0.2g
	チオ硫酸ナトリウム	0.2g
	フェノールレッド	0.02g
	カンテン	15.0g

\* 8時間、10時間、12時間、20時間、24時間、45時間目に各0.5mlを採取し、10<sup>4</sup>〜10<sup>8</sup>倍希釈して標準寒天培地(下記組成を持つ日水製薬社製の培地)に100μl宛をまき込み、生菌数の測定、コロニーの観察を行った。

標準寒天培地(日水製薬社コード番号: 05618)

2.5g  
5.0g  
1.0g  
15.0g  
7.1 ± 0.1

※(通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に平成2年8月17日から微工研菌寄第11664号として国内寄託され、平成3年8月12日より微工研条寄第3509号としてブダペスト条約に従った国際寄託に移管された)以下に記載する形態、生化学的性状に基づき、本細菌は腸内細菌科のセラチア属に属すると推定される。

(a) 形態

1) 短桿状

2) 運動性なし

3) グラム染色性: -

(b) 生育状態

1) 標準寒天培地: 黄〜クリーム色で丸形の不透明コロニーを形成する。

2) S S寒天培地: 白色で半透明なコロニーを形成する。

[S S寒天培地: 日水製薬社コード番号: 05031]

pH: 7.6 ± 0.1

## (c) 生理的性質

1) フォーグス・ブスカウエル反応: +

2) インドールの生成: -

3) 硫化水素の生成: -

4) クエン酸の利用: +

5) ウレアーゼ: -

6) オキシダーゼ: -

7) O-Fテスト: +

(d) 炭素源の利用性

1) ラクトース: +

2) アドニット: -

3) ラムノース: +

4) マンニット: +

5) エスクリン: +

6) イノシット: -

7) ソルビット: +

8) アラビノース: +

9) ラフィノース: +

10) シュクロース: +

(e) その他

1) リジンの脱炭酸反応: -

2) マロン酸の利用: -

3) アルギニンの分解: -

4) フェニルアラニンの脱アミノ化反応: -

5) オルニチンの脱炭酸反応: -

【0023】コロニー2を形成する細菌(識別番号: 900814-2)

(通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に平成2年8月17日から微工研寄第11665号として国内寄託され、平成3年8月12日より微工研寄第3510号としてブダベスト条約に従った国際寄託に移管された) 以下に記載する形態、生化学的性状に基づき、本細菌は腸内細菌科のエンテロバクター属に属すると推定される。

## (a) 形態

1) 短桿状

2) 運動性なし

3) グラム染色性: -

## (b) 生育状態

1) 標準寒天培地: クリーム色で不透明なコロニーを形成する。

2) SS寒天培地: 赤色で不透明なコロニーを形成する。

3) TSI寒天培地: 斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成する。

## (c) 生理的性質

1) フォーグス・ブスカウエル反応: +

2) インドールの生成: -

3) 硫化水素の生成: -

4) クエン酸の利用: +

5) ウレアーゼ: -

6) オキシダーゼ: -

7) O-Fテスト: +

(d) 炭素源の利用性

1) ラクトース: +

2) アドニット: -

3) ラムノース: +

10) 4) マンニット: +

5) エスクリン: +

6) イノシット: -

7) ソルビット: +

8) アラビノース: +

9) ラフィノース: +

10) シュクロース: +

(e) その他

1) リジンの脱炭酸反応: -

2) マロン酸の利用: +

20) 3) アルギニンの分解: +

4) フェニルアラニンの脱アミノ化反応: -

5) オルニチンの脱炭酸反応: +

【0024】コロニー3を形成する細菌(識別番号: 900814-3)

(通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に平成2年8月17日から微工研寄第11666号として国内寄託され、平成3年8月12日より微工研寄第3511号としてブダベスト条約に従った国際寄託に移管された) 以下に記載する形態、生化学的性状に基づき、本細菌は腸内細菌科のバクテロイデス属に属すると推定される。

## (a) 形態

1) 短桿状

2) 運動性なし

3) グラム染色性: -

## (b) 生育状態

1) 標準寒天培地: 黄色で丸形の半透明なコロニーを形成する。

2) SS寒天培地: コロニーを形成しない。

3) TSI寒天培地: 斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成しない。

40) (c) 生理的性質

1) フォーグス・ブスカウエル反応: +

2) インドールの生成: -

3) 硫化水素の生成: -

4) クエン酸の利用: +

5) ウレアーゼ: -

6) オキシダーゼ: -

7) O-Fテスト: +

(d) 炭素源の利用性

50) 1) ラクトース: +



2) アドニット: -

3) ラムノース: +

4) マンニット: +

5) エスクリン: +

6) イノシット: -

7) ソルビット: -

8) アラビノース: +

9) ラフィノース: -

10) シュクロース: +

(e) その他

1) リジンの脱炭酸反応: -

2) マロン酸の利用: +

3) アルギニンの分解: -

4) フェニルアラニンの脱アミノ化反応: -

5) オルニチンの脱炭酸反応: -

【0025】4) コロニー1、2、3をそれぞれ1リットルのL-肉汁培地に移し、37℃で一夜振とうし、

5、000G、4℃で20分間遠心処理して集菌した。

なお、このL-肉汁培地は、ディフコ(Difco)社の

ポリペプトン10g、同社の酵母エキス5g、和光純

薬社の特級NaCl(5g)を蒸留水に入れ、NaOH

でpH7.5に合わせ、オートクレーブし、別途、予め

調製済みの和光純薬社の特級グルコースの40%溶液を

400倍に希釈して加えて調製したものである。

5) 各菌体をそれぞれ50mlの蒸留水に懸濁し、これ

に50mlの90%熱フェノールを加えて65~70℃\*

に50mlの90%熱フェノールを加えて65~70℃\*

乾燥収量 - (蛋白量 + 核酸量)

乾燥収量

【0028】

【表2】

菌体900814-1

総乾燥収量 (mg) 6.8

LPS (mg) 19.8

糖 (mg) 3.1

蛋白 (μg) 86

核酸 (μg) &lt; 161

純度 (%) 96 &lt;

【0029】

【表3】

10

20

30

40

\*で20分間攪拌し、冷却後に、10,000G、4℃で20分間遠心処理して、水層を回収した。フェノール層を更に2回上記と同一の操作に付した。3つの水層を合わせ、一夜透析してフェノールを除去し、内液を、アドヴァンテック・トーヨー(ADVANTEC TOYO)社のUK-200を使用して限外濾過に付して分子量20万カット・オフにより濃縮した(N<sub>2</sub>圧:2気圧)。

6) この濃縮サンプルを、ファルマシア社製のQ-Sepharose Fast Flow)を使って陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。即ち、10mMトリス-HCl(pH7.5)と10mMのNaClを含む緩衝液で試料をカラムに付した後、400mM NaCl/10mMトリス-HCl(pH7.5)でリムラス活性画分を溶出させた。この溶出液を上記と同じ条件で限外濾過に付して脱塩、濃縮して、純度96%以上のLPSを得た。なお、核酸は1M NaCl/10mMトリス-HCl(pH7.5)で溶出した。

【0026】各菌体の結果は次の表2~表4の通りであった。核酸量はOD(260nm)での測定値に基づき(10D=50μg)、純度(%)は次式に基づき計算した。

【0027】

【数2】

菌体900814-2

総乾燥収量 (mg) 10.4

LPS (mg) 75.6

糖 (mg) 2.5

蛋白 (μg) 64

核酸 (μg) &lt; 108

純度 (%) 98 &lt;

【0030】

【表4】

## 菌体900814-3

総乾燥収量 (mg)	19.2
LPS (mg)	103.6
糖 (mg)	7.6
蛋白 (μg)	73
核酸 (μg)	<137
純度 (%)	99<

## 【0031】7) 分子量

各菌株LPSの分子量を、製造例1と同様にしてSDS-2法により測定したら、5,000±1,000 (菌株900814-1に由来するLPS1)、6,500±2,500 (同-2に由来するLPS2及び同-3に由来するLPS3)であった。銀染色におけるそれらの染色帯を図4に示す。図4で、番号1~3がそれぞれLPS1~LPS3に対応する。図4に示されるように、LPS1は分子量3万付近にもややまとまった染色帯を示した。LPS2は30,000から43,000の間にも染色帯が認められるが、14,000以下の染色帯の染色度と比較すると、高分子のものは極めて少ないと推定される。後述する糖量、ヘキサミン量から判断しても、LPS2は最も糖含有率が低く、ついでLPS3、LPS1の順で高くなり、電気泳動で観察されたパターンと一致すると考えられる。又、LPS量/総乾燥収量の比もLPS2、LPS3、LPS1の順に低くなっている。以上の観察結果から、LPS2は比較的低分子のLPSが多く、次いで、LPS3、LPS1の順にその割合は少なくなると推定される。

## 【0032】8) リン含有量

$$\text{リン量 (重量\%)} = \frac{\text{リン量 (μg)}}{\text{サンプル重量 (mg)}} \times 100$$

【0034】リン数は、次式により計算した、分子量5,000当たりの換算数である。

【0035】

【数4】

$$\text{リン数} = \text{リン量 (重量\%)} \times \frac{5,000}{31}$$

※

LPS	吸光度	リン量 (μg/μg)	リン量 (重量%)	リン数
1	0.36	0.54 (32)	1.7	2±1
2	0.31	0.46 (58)	0.8	1~2
3	0.87	1.30 (104)	1.3	2±1

## \* チェン-トリバラ (Chen-Toribara) 法

【チェン等著、「アナリティカル ケミストリ (Analytical Chemistry)」, vol. 28, 1756~1758頁 (1956年) に準拠して次の通りに行った。LPS1、LPS2、LPS3を各別に蒸留水に溶解して、それぞれ、31.6μg、57.6μg、103.6μgのLPSを含む20μlの溶液を調製し、小試験管に入れた。20μlの50v/v%硫酸を添加し、160℃で2時間加熱した。次いで、20μlの10v/v%過塩素酸を添加した後にガスバーナーで1分間加熱して灰化させた。その後0.5mlの蒸留水、次いで0.5mlの反応試薬 (1mlの6N硫酸、2mlの蒸留水、2mlの2.5v/w%モリブデン酸アンモニウム及び1mlの10v/w%のアスコルビン酸を混合して調製し、その0.5mlを使用) を添加して室温で30分間放置した後に、820nmでの吸光度OD (820nm) を測定した。なお、検量線作成用の試料としては、リン酸二水素カリウム (和光純薬社製) を蒸留水で希釈し、リン酸重量としてそれぞれ、2.5μg、1μg、0.25μg、0μgを含む0.5mlの溶液を調製して使用した。なお、リン1gはリン酸二水素カリウム4.39gに相当する。結果を表5に示す。なお、吸光度を示す数値は、無機リンの混入 (例えば、リン酸緩衝液に由来する) による誤差を避けるために、加熱処理をしていない対照のデータを減じた値である。リン量 (μg) は吸光度から計算された値である。リン量 (重量%) は、次式により計算した。なお、式中の「0.67」は、標準のリン1μgのOD値を指し、サンプル濃度は、蒸留水に溶解した各LPSの濃度 (mg/ml) を指す。

【0033】

【数3】

※ サンプル吸光度

※ 【0036】

【表5】

31

## 【0037】9)ヘキサミン含有量

エルソン-モルガン (Elson-Morgan) 法 (東京化学同人出版「生化学実験講座」No. 4の377~379頁)に準拠して次の通りに行った。LPSを蒸留水に溶解して1.58mg (LPS1)、2.88mg (LPS2)、5.18mg (LPS3)/mlの溶液を調製し、その100μlをスクリーキャップ付きスピッツ (イワキガラス社製) に入れ、これに100μlの8N HClを添加して110℃で16時間加熱した。4N NaOHを約200μl添加してpH7とした。その100μlを分取し、別のスクリーキャップ付きスピッツに入れ、200μlの下記試薬Aを加えた後に、105℃で1.5時間加熱し、次いで流水で冷却した。次いで、100μlを分取し、670μlの96%エタノールを加え、更に、67μlの下記試薬Bを加えた後に室温で1時間放置し、535nmで吸光度を測定した。検量線作製用試料としては0.20~200μg/mlのN-アセチル グルコサミン (和光純薬社製) を使った。

(試薬A) 75μlのアセチルアセトンと2.5mlの1.25N炭酸ナトリウムを混合して調製した。

(試薬B) 1.6gのp-メチルベンズアルデヒドと30mlの濃塩酸と30mlの96%エタノールを混合して調製した。

結果、LPS1、LPS2、LPS3のヘキサミン数は各々9±1/分子量5,000、7±1/分子量5,000、5±1/分子量5,000だった。

## 【0038】10) KDO含有量

KDO (2-ケト-3-デオキシオクトネート) 含有量をジフェニルアミン法 [シャビ アール (Shaby R.) 等著、アナリティカル バイオケム (Analytical Biochem.)、58(1)、123~129頁 (1974年)] に準拠して次の通りに行った。500mgのジフェニルアミン、5mlのエタノール、45mlの氷酢酸、50mlの濃塩酸 (全て和光純薬

$$y = x \times 10^{-8} \times \frac{5,000}{0.505 \times 10^{-3}} = 2.19$$

【0042】以下は、本発明のLPSを含む製剤の処方例である。なお、実施例1~4におけるLPS量は、リムラステストによる大腸菌LPS換算量である。

## 実施例1 (錠剤)

小麦LPS	0.04g
6% HPC乳糖	178g
ステアリン酸タルク	8g
バレイショデンプン	14g

以上を混和し、打錠して、0.1mgの小麦LPSを含む0.5gの錠剤400個を調製した。

## 実施例2 (内服液剤)

クロレラLPS 1mg

32

\* 業社製) を合わせてKDO検出試薬を調製した。その500μlに、(1) 0.505mg/mlのLPS1を含む250μl蒸留水溶液; (2) 0.576mg/mlのLPS2を含む250μl蒸留水溶液; (3) 0.518mg/mlのLPS3を含む250μl蒸留水溶液; のいずれかを合わせ、100℃の沸騰水浴中で33分間加熱後に冷水 (24.5℃) 中で30分間冷却し、ついで日立分光光度計320を使い420、470、630、650nmでの紫外部吸収を測定した (測定値を各々A420、A470、A630、A650とする)。標準試料としては、0.5μmol/mlのKDOアンモニウム塩 [米田シグマ (Sigma) 社製] を含む蒸留水250μlを使用した。検体試料、標準試料それぞれについて、次式の値を求めた。

$$S = A420 - A470 + A630 - A650$$

検体試料の値 ( $S_T$ ) はLPS1で0.109、LPS2で0.078、LPS3で0.099であった。標準試料の値 ( $S_s$ ) は0.246であり、蒸留水だけの値は0.005であった。この値の比較により、分子量5,000当たり、LPS1には2±1個、LPS2には1~2個の、LPS3には2±1個のKDOが含まれると推定された。なお、これらの値は、LPS1を例にとると、次のように計算される。溶液に含まれるKDDの濃度を  $x$  (μmol/ml) とすると、

【0039】

【数5】

$$\frac{0.5}{0.246} = \frac{x}{0.109}$$

【0040】上記式から、 $x = 0.221$  となる。従って、LPS1の1μmol (5,000と仮定) に含まれるKDDのモル数を  $y$  とすると、次式により、 $y = 2.19$  となる。

【0041】

【数6】

精製水 1000ml

## 実施例3 (軟膏剤)

LPS1	0.1g
精製ナノリン	80g
黄色ワセリン	適量
	1000g

## 実施例4 (注射剤)

LPS3	0.5mg
注射用蒸留水	適量
合計	1000ml

【0043】実施例1 (リムラステスト陽性植物LPS

の定量)

各種植物に含まれるリムラステスト陽性LPSの定量を、生化学工業株式会社のトキシカラーシステムを使って行った。

①96穴の平底または丸底プレートに注射用蒸留水を1穴当たり180 $\mu$ l入れた。試料20 $\mu$ l（試料が固体の場合には注射用蒸留水に溶解して調製した）をプレートの穴の1つに加えた。プレートミキサーで攪拌しながらピペティングを行って10倍希釈液を調製した。

（以後、順次希釈試料を20 $\mu$ lずつとり、同様に処理することで100倍、1000倍、…と10倍希釈系列液を調製できる。また、注射用蒸留水と試料の量比を変えることにより希釈率は任意に設定できる。）

②内部標準として1.5 $\mu$ g/mlの大腸菌LPS溶液の100、000倍希釈液を調製し、希釈やリムラステスト発色が正常であることを確認した。

③上記①の10倍希釈液35 $\mu$ lを別のプレートの穴にとり、生化学工業株式会社のトキシカラーシステムのLS-1セット35 $\mu$ lを添加し、37℃で30分間放置した。ついで105 $\mu$ lの1M酢酸水を加えて攪拌して反応を停止させた。この試料液の波長415nmでの吸光度を、96穴用吸光度計プレートリーダーMTP-100（コロナ電気株式会社製）で測定した。バックグラ

ンドとしては蒸留水を、検量線作成用としては42pg/mlの生化学工業株式会社のトキシカラーシステムのET-1セットを使用して検量線を作成し、この検量線を基準にして各試料中のリムラステスト陽性LPSの定量を行った。（試料が蒸留水である場合の吸光度を0とした。）なお、この方法で前記LS-1セットを使用した場合には10～45pg/mlの範囲内で発色に定量性があることが確認されたので、この範囲に入らないときは、希釈率を変えて再実験した。希釈試料の定量値は、

（検量線から読み取った値）×（希釈率）  
で計算した。得られた結果を、固体試料の場合にはng/g単位で、液体試料の場合にはng/ml単位で次の表6～表11に示す。なお、表中の試料の欄の会社名、地名等は、当該試料の入手先、産地をさす。かかる記載がない品はスーパーストア忠実屋の神奈川県津久井郡中野町店で購入した品で、製造者が不明なものを指す。なお、「ホクレン」は、北海道農業協同組合連合会の略称である。

【0044】

【表6】

## リムラステスト陽性

試料(固体)LPS量 (ng)藻類植物

松の実(興南貿易) 125

単子葉類

硬質系小麦種子(千葉製粉) 2,250

硬質系小麦種子(千葉製粉)

(分子量5000以上) 1,000,000

硬質系小麦粉(千葉製粉) 7,500

小麦ふすま(千葉製粉)

(分子量5000以上) 300

小麦胚芽(千葉製粉) 1,600

小麦胚芽(千葉製粉)

(分子量5000以上) &lt;10,000

玄米 1,100

米粉(日本穀粉)

(分子量5000以上) 31,000,000

米ぬか 29,000

米ぬか(分子量5000以上) 500,000

コーンフラワー(大洋飼料)

(分子量5000以上) &lt;0.3

コーングリッツ(大洋飼料)

(分子量5000以上) 120

コーン(和光食糧) 200

クマ笹(関本物産) 15,000

アヤメ(種子) 3,300

37	
ニンニク（鱗茎）	70
アスパラガス（芽）	4,500
ミョウガ（花房）	41,000
ヨクイニン（ウチダ和漢薬）	2,300
（原植物は鳩麦）	
ハング（松浦薬業）	5,500
（原植物はカラスビシャク）	
バクモントウ（栃木天海堂）	4,000
（原植物はジャノヒゲ）	
ターメリック（エスビー食品）	195,000
（原植物はウコン）	

# 双子葉類

大豆（三友食品）	150
大豆（ホクレン）（分子量5000以上）	400
丹波黒大豆（和光食糧）	85
小豆（和光食糧）	450
小豆（和光食糧）	
（分子量5000以上）	36,000,000
ひたし豆（和光食糧）	800
大正金時（和光食糧）	550
大福豆（和光食糧）	350
ジャガイモ（ホクレン）	
（分子量5000以上）	<0.3
ビワ（種子）	800
アボガド（種子）	950
モモ（種子）	4,500

39

40

クルミ（種子）	1,900
ソラ豆（種子）	750
カボチャ（種子）	10,000
トマト（生の実）	10,500
カイワレダイコン（根を除く）	50,000
マタタビ（丸久物産）	40,000
アマチャズル（K. K. 桜井）	73,000
ドクダミ（湿潤重量当たり）	
（帝京大学薬用植物園）	1,200
胡椒（白）（エスピー食品）	2,300
トウガラシ（興南貿易）	2,300
八角（興南貿易）	5,500
ナツメグ（ライオン）	2,000
（原植物はニクズク）	
トウヒ（ウチダ和漢薬）	8,000
（原植物はダイダイ）	
カッコン（栃木天海堂）	3,000
（原植物はクズ）	
ナンキンカンゾウ（ウチダ和漢薬）	18,000
オタネニンジン（ウチダ和漢薬）	45,000
ボウフウ（栃木天海堂）	50,000
カンボウイ（栃木天海堂）	600,000
（原植物はオオツツラフジ）	
チョウトウコウ（ウチダ和漢薬）	7,000
（原植物はウンカリア・ヒルスタ）	
八味地黄丸（カネボウ薬品）	17,000

41	
小柴胡湯（ツムラ）	13,000
五苓湯（ツムラ）	12,000
猪苓湯（ツムラ）	14,000
十全大補湯（ツムラ）	8,000
八味地黄丸（ツムラ）	8,000
ローヤルゼリー	1,000
【ベキン ローヤルゼリー（Pekin Royal Jelly）	
ハチミツ（加藤美峰園本舗）	800
<u>シダ植物</u>	
スギナ（湿潤重量当たり）	700
（帝京大学薬用植物園）	
ゼンマイ（関本物産）	10,000
<u>ソウ類</u>	
わかめ（三陸天然品）	11,000
わかめ芽株（森谷健康食品）	200,000
ひじき（生）	85,000
芽ひじき（小善本店）	105,000
コブ（ヤマトタカハシ）	235,000
アサクサノリ（乾燥生ノリ）	130,000
クロレラ（株式会社ヘルスタージャパンYS）	1,900,000
クロレラ（株式会社マンナンフーズYS）	1,000,000
<u>菌類</u>	
椎茸（下仁田産）	16,000
えのき茸（長野県中野市）	20,000
しめじ（勢多郡宮城町）	40,000
まいたけ（大利根）	205,000



43	
あわび茸（羽生）	8,000
マッシュルーム	20,000
きくらげ	75,000
ナメコ	21,000
エビオス（アサヒビール社製 ビール酵母）	250,000
冬虫夏草	240,000

その他

雪印ナチュレヨーグルト（株式会社雪印）	5,000
グリコビフィズスヨーグルト（株式会社グリコ）	50

## リムラステスト陽性

<u>試料（液体）</u>	<u>LP S 量（mg）</u>
<u>ビール</u>	
キリン ファインビルスナー	1,150
ラガービール	1,250
ハートランド	1,550
ファインドラフト	1,400
アサヒ スーパースーパースト	600
<u>ワイン</u>	
サントリー サントネージュ（白）	13
（赤）	24
シードル（アップル）	900

日本酒

大関一級（大関酒造）	2.4
黄桜二級（黄桜酒造）	1.7

大寒吟醸二級（玉泉堂酒造）	2. 1
玄米酒	
日ター麒（大関酒造）	1 2
麦味酒	
陶陶酒デルカップ（陶陶酒本舗）	1. 2
焼酎	
宝焼酎（宝酒造）	< 2. 0
その他	
キョーレオピン（湧永製薬）	6 0 0
ニンニク抽出液（湧永製薬）	3 5 0
グロスキュー（クロレラ工業）	6, 0 0 0
大妻健康メッコール（韓国・一和）	2, 0 0 0
サクロンハーブ液（エーザイ）	1, 0 0 0
ヘチマ水（自家製）	7 0 0
バイオアルゲン（クロレラ工業）	4 0 0
バンシロン内服液（ロート製薬）	2 0 0
ユンケルファンティ（佐藤製薬）	5 0
コリホグス（小林製薬）	3 0
ツディ（三井）	2 0
ミオDコーワ100（コーワ）	1 0
リゲイン（三井）	9
ロアレン50（第一製薬）	7
ソルマック（大鵬製薬）	8
ローゼリーゴールド（中外製薬）	5
バスビタン30（常盤製薬）	5
チオピタ（大鵬製薬）	5未満
リボピタン（大正製薬）	5未満
アスバラゴールド（田辺製薬）	5未満

【0045】実験例2（マクロファージのインビトロTNF産生能を活性化する場合のED<sub>50</sub>。を与えるリムラステスト陽性LPSの含有量が0. 4~100ng/培養液mlであるLPSの選択方法）

9週齢の、平均体重29gの各群3匹のオスのC3H/Heマウスのマクロファージ腹腔常在細胞200μl

（2×10<sup>5</sup>個）/穴を96穴の平底プレートに入れ、プライマーとしての組換えマウス1FN-α（100単

位/ml）を各穴に10μl宛加えた。別途、各種LPS源を65℃の熱水（g/ml）で5時間抽出して調製した抽出液を各種希釈し、その10μl/穴をプライマー投与の3時間後にトリガーとして加えた。2時間培養後に遠心分離操作に付した（3000G、20分）。各穴から得られた130μlの、TNF活性はL929細胞に対する毒性に基づいて測定し、又、リムラステスト陽性LPS含有量は生化学工業株式会社のトキシカラ-

システムを使用して測定した。測定値を、縦軸にTNF産生量(単位/培養液ml)を、横軸(対数尺)に対応リムラステスト陽性LPS含有量(ng/培養液ml)を表す座標にプロットし、プロットされた各点から推定されるシグモイド曲線を描いた。トリガーを投与しなかった場合のTNF産生量を与える各トリガーのマクロファージ活性化能を0%とし、トリガー投与の効果として増大するTNF産生量が最大恒量に達したときの各トリガーのマクロファージ活性化能を100%とし、その50%に相当するマクロファージ活性化能を与えるリムラステスト陽性LPS含有量を曲線から読み取った。マクロファージ活性化能とリムラステスト陽性LPS含有量との相関関係が上記条件を満たしたLPS採取源の結果を表12～表14に示す。表中で、「TNF」はTNF

産生量(単位/培養液ml)を、「活性化能」はマクロファージ活性化能(%)を、「LPS」はリムラステスト陽性LPS含有量(ng/培養液ml)を表す。なお、トリガー無添加時のTNF産生量は0.75単位/mlであったので、TNF産生量が0.75単位/ml以下である場合をマクロファージ活性化能0%とし、マクロファージ活性化能(%)は次式により計算した。

{0046}

{数7}

$$10 \quad \frac{\text{TNF産生量} - 0.75}{\text{TNF産生最大恒量} - 0.75} \times 100$$

{0047}

{表12}

LPS源	TNF	活性化能	LPS
ターメリック	0.75	0	0
	3.9	9	0.6
	36.3	100	60
	36.3	100	> 1000
カンボイ	0.75	0	0
	40.7	100	4
	36.5	90	400
	40.7	100	> 1000
コンブ	0.75	0	0
	1.3	4	0.8
	13.0	100	80
	13.0	100	> 1000
アサクサノリ	0.75	0	0
	1.0	2	0.3
	12.8	100	30
	12.8	100	> 1000
ワカメ芽株エキス	0.75	0	0
	1.3	4	0.2
	15.5	100	20
	15.5	100	> 1000
芽ヒジキ	0.75	0	0
	5.7	8	0.7
	62.7	100	70
	62.7	100	> 1000

【表13】

エビオス	0.75	0	0
	0.6	0	0.7
	30.6	100	70
	30.6	100	> 1000
冬虫夏草	0.75	0	0
	2.0	4	0.4
	30.3	100	40
	30.3	100	> 1000
ワカメ芽株	0.75	0	0
	0.9	1	0.4
	22.7	100	40
	22.7	100	> 1000
クロレラ	0.75	0	0
	39.2	100	9.6
	35.0	89	960
大腸菌 L P S	0.75	0	0
	3.6	27	2
	10.2	89	20
	11.4	100	200
	10.9	95	2000
小麦 L P S	0.75	0	0
	0.7	0	2
	10.1	99	21
	10.2	100	210
	8.5	82	2100

百日咳菌LPS	0.75	0	0
	0.7	0	11
	3.3	55	110
	5.4	100	1100
リビドA	0.75	0	0
	4.7	37	2
	9.4	80	24
	11.1	96	240
	11.5	100	2400

【0048】実験例3（実験動物での発育促進効果—その1）

C3H/He雄マウスに、出生後、蒸留水（6匹）、LPS換算でそれぞれ5ng/ml（6匹）、50ng/ml（5匹）の粉末A-a<sub>2</sub>（製造例1）を含むように調製した蒸留水を自由摂取させた。（以下、それぞれ、蒸留水摂取群、5ng摂取群、50ng摂取群と称す。）他の給餌条件は全く同様であり、株式会社日本\*

\*クレア市販のラット、マウス用の飼料CE-2を自由摂取させた。出生後に体重を測定し、各群の平均値（/匹）として、次の表15に示す結果が得られた。表中、5ng摂取群、50ng摂取群の欄中の増加率は、それぞれこれらの平均値の、蒸留水投与群の平均値に対する増加率（%）を表している。

【0049】

【表15】

日齢	蒸留水投与群 の体重（g）	5ng投与群		50ng投与群	
		体重（g）	増加率（%）	体重（g）	増加率（%）
20	11.4	11.4	0.0	13.4	17.5
25	16.4	16.1	-1.8	18.0	9.8
29	19.9	19.7	-1.0	21.1	6.0
33	21.6	21.3	-1.4	22.7	5.1
37	21.9	22.0	0.5	22.9	4.6
41	21.8	22.2	1.8	23.2	6.4
45	23.3	24.1	3.4	25.1	7.7
49	23.4	24.6	5.1	25.5	9.0
53	24.2	25.2	4.1	26.5	9.5

【0050】図5は、表15に示した結果をグラフ化したものである。表15及び図5より、本発明のLPSが有意な発育促進効果を示すことが明らかである。

【0051】実験例4（実験動物での発育促進効果—その2）

懐妊しているC3H/He雌マウスに蒸留水、LPS換算でそれぞれ5ng/ml、50ng/mlの粉末A-50

a<sub>2</sub>（製造例1）を含むように調製した蒸留水を自由摂取させた。（以下、それぞれ、蒸留水摂取群、5ng摂取群、50ng摂取群と称す。）摂取開始後6日目に蒸留水摂取群マウスから誕生した雌マウスを5匹、5ng摂取群から誕生した雌マウスを7匹、50ng摂取群から誕生した雌マウスを4匹選び、誕生後20日目からそれぞれ親マウスと同じ物を摂取させた。他の給餌条件

は誕生前から全く同様であり、株式会社日本クレア市販のラット、マウス用の飼料C E-2を自由摂取させた。誕生後20日目から各マウスの体重を測定し、各群の平均値(ノ匹)として、次の表16に示す結果が得られた。表中、5ng摂取群、50ng摂取群の欄中の増加\*

\*率は、それぞれ、それらの平均値の、蒸留水投与群の平均値に対する増加率(%)を表している。

【0052】

【表16】

日 齢	蒸留水投与群 の体重(g)	5 n g 投与群		5 0 n g 投与群	
		体重(g)	増加率(%)	体重(g)	増加率(%)
20	10.4	10.4	0.0	12.9	24.0
25	13.0	13.6	4.6	15.9	22.3
29	14.8	16.0	8.1	17.3	16.9
33	16.2	17.4	7.4	19.1	17.9
37	16.7	17.9	7.2	19.9	19.2
41	17.1	18.1	5.8	19.7	15.2
45	18.5	19.0	2.7	20.8	12.4
49	17.8	19.3	8.4	21.1	18.5
53	18.7	19.6	4.8	21.8	16.6

【0053】図6は、表16に示した結果をグラフ化したものである。表16及び図6より、本発明のLPSが有意な発育促進効果を示すこと、又、表15及び図5に示した結果との比較により、誕生後に本発明のLPSを初めて摂取させるよりも、懷妊中の親にも摂取させることによりその発育促進効果は約2倍になることを示している。

#### 【0054】投与量、投与間隔、毒性値

本発明のLPSを発育促進剤、動物用発育促進剤として投与するさいの量、投与間隔は、当然、担当医師或いは獣医師の厳重な管理下、投与対象の年齢、症状、体重、投与効果を勘案して個別に決定されるが、人間の成人(60kg)で、経口投与で1μg~100mg、静脈投与で10ng~10mg、経皮投与で100ng~1mgが1日1回の投与量の一応の目安となる。なお、動物では、牛、馬等の大型動物は上記の量の60分の1を体重1kg当たりの量の目安とし、豚、犬、猫等の中型、小型の動物ではその2倍量を体重1kg当たりの量の目安とし、鶏等の鳥類では更にその2倍量を体重1kg当たりの量の目安とし投与される。なお、ベーレンス・クルパー (Behrens K

μg/匹であり、大腸菌LPS [米國ディフコ (Difco) 社製0128:B8]の値300μg/匹の60%以下であった。又、小麦LPS (製造例1)、大腸菌LPS (同上)、百日咳菌LPS (製造例3)の毒性値LD<sub>50</sub>。(1群2匹の雄BALB/Cマウス、平均体重45g、における平均値)は静脈内投与でそれぞれ3、2、3、4、11mg/kgであり、皮内投与でそれぞれ16、16、32mg/kgだった。

#### 【0055】

【発明の効果】本発明により、優れた発育促進効果を有し、未熟児の誕生を予防し、副作用や体内残留性の問題がなく、長期使用が可能であり、生産コストが低く、しかも、経口、経皮、薬浴、注射のいずれの経路でも投与可能な、大量に供給可能な発育促進剤、動物用発育促進剤が提供される。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】小麦LPSをガスクロマトグラフィーにかけて得られる、分子中における脂肪酸の存在を示すピークを图示したチャートである。

【図2】大腸菌LPSをガスクロマトグラフィーにかけて得られる、分子中における脂肪酸の存在を示すピークを图示したチャートである。

【図3】百日咳菌LPSをガスクロマトグラフィーにかけて得られる、分子中における脂肪酸の存在を示すピークを图示したチャートである。

【図4】LPS1、LPS2、LPS3の、SDS-2

ber) 法により計算した、7週齢の平均体重22gのC3H/He雄マウスにおけるLPS1、LPS2、LPS3のLD<sub>50</sub>。はそれぞれ150、180、180

法におけるパターンを示す図である。

【図5】本発明のLPSの発育促進効果を示すグラフである。

【図6】本発明のLPSの発育促進効果を示すグラフである。

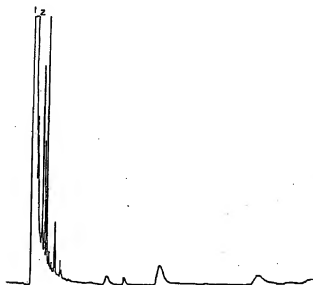
【符号の説明】

\*

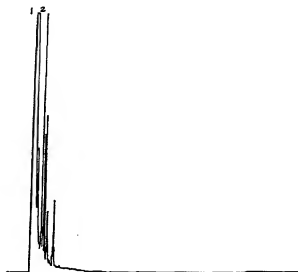
\* 図4において、1はLPS1の、2はLPS2の、3はLPS3のパターンを示す。

図5、図6において、は蒸留水投与群の、△は本発明のLPSの5ng投与群の、▲は本発明のLPSの50ng投与群のデータを示す。

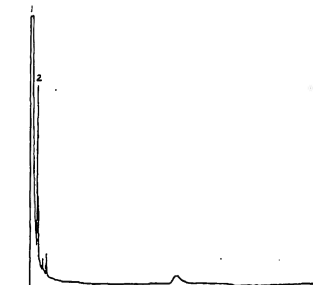
【図1】



【図2】

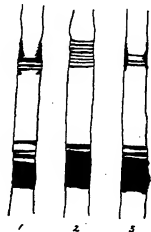


【図3】



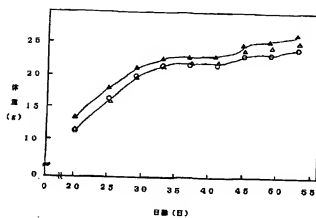
【図4】

14,000 +  
67,000 +  
48,000 +  
30,000 +  
20,000 +  
17,000 +  
12,000 +  
10,000 +  
8,000 +  
6,000 +  
5,000 +  
2,000 +

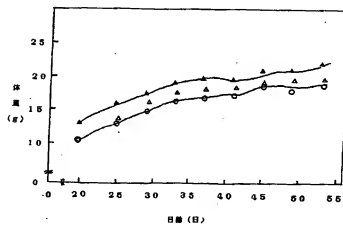




【図5】



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 月岡 大輔  
千葉県千葉市春日 1-21-17  
(72)発明者 水野 伝一  
神奈川県鎌倉市岡本18

(72)発明者 大島 治之  
東京都八王子市館町1097館ヶ丘団地2-1  
- 513